

Immunchemische Untersuchungen zur Funktion
und strukturellen Organisation des Membranteils
(CF_0) der photosynthetischen ATP-Synthase

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

LUDGER KLEIN-HITPASS
aus Ringenberg
Bochum 1983

Immunologische Untersuchungen zur Funktion
des Thymusdrüsenorgans bei Mäusen
1961, der Immunologischen Zeitschrift

Immunologische Untersuchungen zur Funktion
des Thymusdrüsenorgans bei Mäusen
eines Beitrags zur Immunologie
der Thymusdrüse
an der Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. R. J. Berzborn
Koreferent: Prof. Dr. W. G. Hanstein

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
I. Einleitung	1
II. Problemstellung	6
III. Ergebnisse	8
1. Isolierung von CF_1 - CF_0 -Komplex durch Immunpräzipitation bzw. Triton X-100-Extraktion	8
1.1. Immunpräzipitation von CF_1 - CF_0 -Komplex aus Triton X-100-Extrakten	8
1.2. Optimierung der CF_1 - CF_0 -Extraktion	10
1.3. Isolierung von CF_1 - CF_0 -Komplex durch Triton X-100-Extraktion, Anionenaustauscher-Chromatographie und Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation	12
1.4. Rekonstitution des isolierten CF_1 - CF_0 -Komplexes in Liposomen	16
2. Isolierung der Proteolipid-Untereinheit des CF_0 -Komplexes	18
2.1. Proteolipid-Isolierung aus Thylakoidmembranen	18
2.2. Proteolipid-Extraktion aus isoliertem CF_1 - CF_0 -Komplex	19
3. Herstellung und Charakterisierung von CF_1 - CF_0 - bzw. CF_0 -Antisera	20
3.1. Herstellung und Charakterisierung von Antisera gegen isolierten CF_1 - CF_0 -Komplex	20
3.2. Herstellung und Charakterisierung von Antisera gegen immunpräzipitierten CF_1 - CF_0 -Komplex	23
3.3. Herstellung und Charakterisierung von CF_0 -Komplex-Antisera	24
1. Absorption der CF_1 -Antikörper aus den CF_1 - CF_0 -Antisera	25
2. Charakterisierung der CF_0 -Antisera	27
3.4. Herstellung und Charakterisierung von Antisera gegen die Proteolipid-Untereinheit des CF_0	31
IV. Diskussion	34
V. Ergebnisse	42
4. Quantitative Bestimmung von CF_0 durch Elektroimmundiffusion	42
4.1. Rocketbildung mit detergenzsolubilisierten Thylakoidmembranen	42
4.2. Rocketbildung mit detergenzextrahiertem CF_1 - CF_0 -Komplex	43

4.3. Vergleichbarkeit von CF_0 - und CF_1 - CF_0 -Rockets; Immunpräzipitation von CF_1 - CF_0 -Komplex aus in Triton X-100 solubilisierten Membranen	44
4.4. Bestimmung von CF_0/CF_1 -Verhältnissen in Thylakoidmembranen und in CF_1 - CF_0 -Präparaten	47
4.5. Verteilung von CF_1 und CF_0 innerhalb des Thylakoidmembransystems	50
5. Untersuchungen zur Funktion und zur Erreichbarkeit des CF_0 von der Matrixseite der Thylakoidmembran her	53
5.1. Einfluß der CF_0 -Antiseren auf die Rückbindung von CF_1 an EDTA-behandelte Membranen	54
5.2. Vorinkubation von Thylakoidmembranen mit CF_0 -Antiserum; Einfluß auf die CF_1 (CF_0)-Rocketlänge	56
5.3. Einfluß der CF_0 -Antiseren auf die zyklische Photophosphorylierung	59
5.4. Absorption der hemmenden Antikörper aus den CF_0 -Antiseren durch Vorinkubation mit Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Membranen	61
5.5. Einfluß der CF_0 -Antiseren auf die H^+ -Aufnahme in Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten	66
5.6. Einfluß der CF_0 -Antiseren auf die Photophosphorylierung in EDTA-behandelten Chloroplasten	69
5.7. Identifizierung der für Antikörper zugänglichen CF_0 -Untereinheiten des membrangebundenen CF_1 - CF_0 - bzw. CF_0 -Komplexes	72
6. Untersuchungen zur Erreichbarkeit des CF_0 von der Lumenseite der Thylakoidmembran her	75
6.1. Präparation von CF_0 enthaltenden inside-out-Vesikeln	76
6.2. CF_0 -Rocket-Verkürzungstest mit i.o.-Vesikeln	79
VI. Diskussion	82
VII. Zusammenfassung	95
VIII. Material und Methoden	97
IX. Literaturverzeichnis	110

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AS	Antiserum
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CF ₀	Membranintegraler Teil der ATP-Synthase aus Chloroplasten
CF ₁	Peripherer Teil der ATP-Synthase aus Chloroplasten (Kopplungsfaktor)
Chl	Chlorophyll
cpm	counts per minute
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DOC	Na-Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EID	Elektroimmundiffusion
FNR	Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase
i.o.	inside out
IgG	Immunglobulin G
kd	Kilodalton
KS	Kontrollserum
LHCP	light-harvesting-chlorophyll-protein
OD	Optische Dichte
P	Orthophosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMS	N-Methylphenanzinmethosulfat
PS I, II	Photosystem I, II
PS 3	Thermophiles Bakterium
PSP	Photosynthetische Phosphorylierung
rpm	rounds per minute
RSA	Rinderserumalbumin
r.s.o.	right side out
RT	Raumtemperatur (22° C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

I. EINLEITUNG

ATP-Synthase-Komplexe, die eine wichtige Rolle in energiekonservierenden Reaktionen der oxidativen und photosynthetischen Phosphorylierung spielen, konnten in der inneren Mitochondrien-Membran, in der Cytoplasma-Membran von Bakterien und in der Thylakoidmembran von Chloroplasten gefunden werden (31, 39, 75, 77, 97, 98). Sie katalysieren die Phosphorylierung von ADP zu ATP, einer Verbindung, die aufgrund ihres hohen Phosphatgruppen-Übertragungspotentials eine zentrale Rolle in energieverbrauchenden Prozessen einnimmt.

Die Bildung von ATP durch die ATP-Synthase-Komplexe ist stets gekoppelt an die Funktion von respiratorischen oder photosynthetischen Elektronentransport-Systemen, die durch vektoriellen Elektronen- und H^+ -Transport einen elektrochemischen H^+ -Gradienten über einer Membran erzeugen. Die Energie dieser H^+ -Gradienten - die sogenannte proton motive force (pmf) - wird nach der "chemiosmotischen" Theorie von MITCHELL (71) - in einem mechanistisch noch nicht geklärten Prozeß - für die endergone ATP-Bildung durch die ATP-Synthasen genutzt.

Trotz der Komplexität der ATP-Synthase-Komplexe weisen die Proteine verschiedener Organismen eine Reihe von gemeinsamen Eigenschaften bezüglich Struktur und Funktion auf. Ausführlich soll hier aber zunächst nur auf die ATP-Synthase der Chloroplasten-Thylakoidmembran eingegangen werden. Sie ist aus einem peripheren, hydrophilen und einem mutmaßlich membranintegralen, hydrophoben Teil aufgebaut. Der periphere Teil - Kopplungsfaktor 1 der Chloroplasten genannt - trägt das katalytische Zentrum, bindet also die Substrate der Photophosphorylierungsreaktion. Er kann durch EDTA- oder Pyrophosphat-Behandlung (15, 50, 54) von der Thylakoidmembran abgelöst und bis zur Homogenität gereinigt werden (27, 64). Die Entfernung des CF_1 von der Thylakoidmembran führt zum Verlust der Photophosphorylierungskapazität und zu einer Beschleunigung des Elektronentransportes (15, 54). Der isolierte CF_1 besitzt keine ATP-Synthase-Aktivität mehr; nach Aktivierung durch Hitze (36), DTT (37) oder Trypsin (115) weist das Protein jedoch Ca^{2+} -abhängige ATPase-Aktivität auf.

Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen (42, 52, 69, 84) und Hemmversuchen mit Antikörpern (23, 57, 67) wurde geschlossen, daß der CF_1 auf der dem Stroma zugewandten Seite der nichtgestapelten Bereiche des Thylakoidmembransystems lokalisiert ist. Die Abwesenheit des CF_1 in den Regionen mit engem Membrankontakt (partitions) konnte auch durch CF_1 -Gehaltsbestimmungen von als inside-out-Vesikeln (11) isolierten partition-Membranen wahrscheinlich gemacht werden (24).

Die Analyse des CF_1 durch SDS-PAGE ergab (20, 63), daß er aus 5 verschiedenen Untereinheiten, α - ϵ nach abnehmenden Molekulargewicht benannt, besteht. Die Molekulargewichte wurden nach SDS-PAGE mit 59000, 56000, 37000, 17500 und 13000 bestimmt (63). In mitochondrialen (31) und bakteriellen (39) Kopplungsfaktoren verschiedener Spezies konnten ebenfalls fünf nicht identische Untereinheiten mit vergleichbaren Molekulargewichten nachgewiesen werden. Die Untereinheiten-Stöchiometrie scheint trotz Anwendung verschiedenster Techniken und Strategien noch nicht abschließend geklärt zu sein. Neuere Untersuchungen von SUESS & SCHMIDT (112) ergaben eine $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ -Stöchiometrie für CF_1 aus *Vicia faba* und *Avena sativa*, während frühere Befunde auf eine $\alpha_2\beta_2\gamma_1-2\delta_1\epsilon_{1-2}$ -Stöchiometrie hindeuteten (16, 20, 27, 76). δ -Gehaltsbestimmungen von isoliertem und membrangebundenem CF_1 aus Spinat-Chloroplasten mittels quantitativer Elektroimmundiffusion ergaben jedoch zwei δ -Untereinheiten pro CF_1 -Molekül (88).

Um Informationen über die Funktion der einzelnen Untereinheiten sowie die strukturelle Organisation des komplexen CF_1 -Moleküls zu bekommen, wurden immunchemische Methoden, Labeltechniken, Kreuzvernetzungsstudien und Rekonstitutionsexperimente angewendet und durchgeführt. Aus Hemmversuchen mit Antisera gegen isolierte Untereinheiten wurde geschlossen, daß die α -Untereinheit eine "high affinity site" für ATP besitzt und vielleicht regulierende Funktion hat (78). Die γ -Untereinheit spielt eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierungsreaktion und besitzt eine Bindungsstelle für die ϵ -Untereinheit (78), der wiederum ATPase-Inhibitor-Eigenschaften nachgewiesen wurden (80). Die

Hemmbarkeit der Photophosphorylierung durch α - und γ -Antikörper sowie die positive Agglutination von Chloroplasten durch β -Antikörper beweisen klar, daß zumindest Teile dieser Untereinheiten die Oberfläche des CF_1 -Moleküles bilden. Das Fehlen von Agglutination trotz Hemmung der Photophosphorylierung durch γ -Antikörper deutet darauf hin, daß γ eine mehr zentrale Position, vielleicht nahe der Membran, einnimmt (78), die eine Vernetzung von γ -Untereinheiten von CF_1 -Molekülen auf verschiedenen Thylakoiden durch die bivalenten Immunglobuline nicht ermöglicht.

Das katalytische Zentrum des CF_1 ist wahrscheinlich auf der β -Untereinheit lokalisiert (75). Mit Hilfe eines Photoaffinitätslabels konnte gezeigt werden, daß die β -Untereinheit des membrangebundenen CF_1 eine Hochaffinitätsstelle für ADP trägt (32). Frühere Befunde machten jedoch wahrscheinlich, daß auch die α -Untereinheit Nukleotidbindestellen besitzt (78). In wiefern welche Nukleotidbindestellen katalytische oder nur regulierende Funktion haben, ist noch umstritten. Abgesichert scheint jedoch, daß die kleinen Untereinheiten γ , δ und ϵ für die ATPase-Aktivität von isoliertem CF_1 nicht notwendig sind, da CF_1 -Fragmente, die nur aus α und β bestanden, noch Aktivität besaßen (121).

BAIRD & HAMMES (16) erarbeiteten basierend auf Kreuzvernetzungsstudien mit chemischen crosslinkern ein Strukturmodell für CF_1 , welches eine enge Nachbarschaft der großen Untereinheiten α , β und γ zueinander vorsieht, d.h. daß je 2 benachbarte α - und β -Untereinheiten um die zentral angeordneten γ und δ -Untereinheiten gruppiert sind. Da keine Aggregate von δ mit γ und ϵ gefunden werden konnten, wurden diese räumlich voneinander getrennt angeordnet.

Rekonstitutionsexperimente lieferten weitere Beiträge zum Verständnis der Funktionen der CF_1 -Untereinheiten. Rekonstitution eines aktiven CF_1 aus seinen isolierten Untereinheiten, wie für den Kopplungsfaktor TF_1 aus dem thermophilen Bakterium PS3 (119) beschrieben, ist mit Kopplungsfaktor aus Chloroplasten noch nicht gelungen. Es konnten aber CF_1 -Fragmente hergestellt werden, denen vorzugsweise eine oder mehrere der kleineren Untereinheiten fehlten (88, 121, 123). Unabhängig voneinander konnte so in zwei Ar-

beitsgruppen (12, 88) durch Bindungsversuche mit δ -freiem CF_1 gezeigt werden, daß die δ -Untereinheit, deren Funktion bei der Bindung des CF_1 an die Membran nachgewiesen schien (123), für die Bindung nicht notwendig ist. Da δ , obwohl es spezifisch an den Membranteil der ATP-Synthase binden kann, nur in Kombination mit δ -freiem CF_1 die Photophosphorylierungskapazität von CF_1 -verarmten Thylakoiden stimuliert, wurde geschlossen, daß seine Rolle in der Kopplung des Protonenstroms durch CF_0 an die ATP-Synthase zu sehen ist (88). Da auch noch ein nur aus α, β und γ bestehender Salat- CF_1 zur Bindung an CF_1 verarmte Thylakoidmembranen fähig war, wurde geschlossen, daß auch ϵ keine Bindungsfunktion hat (88). Diese Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick Befunden zu widersprechen, die an Kopplungsfaktoren aus dem thermophilen Bakterium PS3 und E. coli erarbeitet wurden. δ und ϵ aus diesen Bakterien sollen an der Bindung des TF_1 bzw. EF_1 an die Membran beteiligt sein (104, 108, 119). Dies zeigt klar, daß die Übertragung der an Bakterien- und Mitochondrien-ATP-Synthase gewonnenen Erkenntnisse auf die ATP-Synthase aus Chloroplasten nicht immer gerechtfertigt ist.

Die strukturelle Rolle des membranintegralen CF_0 -Teils als CF_1 -Bindestelle sowie die katalytische Rolle als spezifischer H^+ -Kanal sind, wenngleich die molekularen Vorgänge unklar sind, unbestritten. Die Entfernung des CF_1 durch EDTA-Behandlung (15, 54) führt über eine erhöhte H^+ -Leitfähigkeit der Membran zu einer Verringerung des pH-Gradienten über der Thylakoidmembran und einer Beschleunigung des Elektronentransportes. Rückbindung von CF_1 (67) oder Zugabe des Energietransferinhibitors DCCD (68) verschließt den H^+ -Kanal wieder, vergrößert dadurch den pH-Gradienten und stimuliert daher die Photophosphorylierungs-Kapazität von EDTA-behandelten Chloroplasten.

NELSON et al. (79) konnten durch Markierungsexperimente mit ^{14}C -DCCD zeigen, daß der Hemmstoff kovalent an eine Untereinheit des CF_0 -Komplexes bindet. Diese - im funktionellen CF_0 -Komplex vermutlich als Hexamer organisierte - Untereinheit (103), das sogenannte DCCD-bindende Proteolipid, konnte mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln aus Chloroplasten extrahiert (100, 103) und durch Ionenaustauscher-Chromatographie bis zur Homo-

genität gereinigt werden (101). Nach Rekonstitution des isolierten Proteolipids in Lipidvesikel (Liposomen) aus Chloroplastenlipiden zusammen mit Bacteriorhodopsin konnte lichtabhängige und durch DCCD stimulierbare Akkumulierung von Protonen in den Vesikeln nachgewiesen werden (79), ein eindeutiger Beweis für die Beteiligung des Proteolipids an der H^+ -Translokation über die Membran.

Das DCCD-Bindungsprotein konnte bereits aus verschiedenen Organismen isoliert (3, 38, 44, 100) und sogar sequenziert werden (96). Die entsprechenden Proteine aus Mitochondrien, Bakterien und Chloroplasten weisen erstaunliche Homologien auf. Das Vorhandensein einiger invarianter sowie einer ganzen Reihe von isofunktionellen Aminosäuren in den Proteolipiden aus phylogenetisch weit voneinander entfernten Organismen wird als Indiz dafür gewertet, daß diese invarianten Aminosäuren und eine bestimmte Quartärstruktur unerläßlich für die Funktion des Proteins sind (95).

Neben dem Proteolipid werden dem CF_0 -Komplex mehrere weitere Untereinheiten zugerechnet. Da der CF_0 -Komplex aus Chloroplasten bislang nicht in befriedigender Reinheit (122) isoliert werden konnte, wird seine Untereinheiten-Zusammensetzung als Differenz zwischen CF_1 - und CF_1 - CF_0 -Untereinheiten-Zusammensetzung studiert. Die Extraktion von nach Rekonstitution in Liposomen katalytisch aktivem CF_1 - CF_0 -Komplex gelang 1973 CARMELI & RACKER (29) mittels Cholat. 1979 stellten PICK & RACKER (86) eine verbesserte Methode zur Isolierung und Reinigung des Enzymkomplexes vor. Der mit Cholat/Octylglucosid extrahierte CF_1 - CF_0 -Komplex wies neben den 5 CF_1 -Untereinheiten und dem Proteolipid noch 3 weitere, dem CF_0 zugerechnete Peptide auf, deren Molekulargewichte mit 13,5, 15,5 und 17,5 kd angegeben wurden. Mehrere Autoren (46, 49, 74, 112) geben neuerdings nur noch 3 CF_0 -Untereinheiten, mit I=15,5, II=13,5 und III=8 kd (Proteolipid) bezeichnet, an.

Über die Funktionen der CF_0 -Untereinheiten I und II gibt es praktisch keine Erkenntnisse. Da an mit funktionell intaktem Proteolipid beladene Lipidvesikel kein CF_1 gebunden werden

konnte (102) bzw. keine spezifische Bindung festgestellt werden konnte (34), muß angenommen werden, daß I oder (und) II eine Rolle bei der Bindung des CF_1 an die Membran spielen. Bei dem TF_0 -Komplex aus dem thermophilen Bakterium PS3, dem wohl am besten untersuchten Objekt, konnte in der Tat eine vom Proteolipid verschiedene TF_0 -Untereinheit für die Bindung des peripheren TF_1 verantwortlich gemacht werden (106). Ob sich diese an TF_0 gewonnenen Erkenntnisse - wie in einem von NELSON et al. (81) vorgeschlagenen Modell für die Struktur des CF_0 geschehen - auf CF_0 übertragen lassen, muß wegen der schon angesprochenen möglichen Unterschiede der ATP-Synthasen aus verschiedenen Organismen erst durch experimentelle Untersuchungen abgesichert werden.

II. PROBLEMSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit soll mittels immunochemischer Methoden versucht werden, Informationen über die strukturelle Organisation des CF_0 -Komplexes und die Funktion der Untereinheiten zu sammeln.

Im einzelnen soll mit Hilfe von herzustellenden Antiseren untersucht werden, ob und welche Untereinheiten des CF_0 von der Matrixseite der Chloroplasten her für die membranimpermeablen Antikörper zugänglich sind. An inside-out-Vesikeln, in denen die Lumenseite der Thylakoidmembran für hydrophile Sonden wie Antikörper zugänglich ist, soll auch die Erreichbarkeit des CF_0 für Antikörper von der Thylakoidlumenseite her untersucht werden. Weiter soll versucht werden, die für die Bindung des peripheren CF_1 an den CF_0 verantwortliche(n) CF_0 -Untereinheit(en) zu identifizieren.

Mit Hilfe der CF_0 -Antiseren soll auch eine quantitative immunologische Methode für CF_0 ausgearbeitet werden, die es erlaubt, membrangebundenen und detergentextrahierten CF_0 schnell und einfach zu bestimmen.

Die Arbeit gliedert sich in folgende Abschnitte:

1. Isolierung von CF_1 - CF_0 -Komplex durch Immunpräzipitation bzw. Triton X-100-Extraktion
2. Isolierung der Proteolipid-Untereinheit des CF_0 -Komplexes
3. Herstellung und Charakterisierung von CF_1 - CF_0 - bzw. CF_0 -Antiseren
4. Quantitative Bestimmung von CF_0 durch Elektroimmundiffusion
5. Untersuchungen zur Funktion und zur Erreichbarkeit des CF_0 von der Matrixseite der Thylakoidmembran her
6. Untersuchungen zur Erreichbarkeit des CF_0 von der Lumenseite der Thylakoidmembran her

III. ERGEBNISSE

1. Isolierung von CF_1 - CF_0 -Komplex durch Immunpräzipitation bzw. Triton X-100-Extraktion

Um Antiseren guter Spezifität gegen den CF_0 -Komplex oder CF_0 -Untereinheiten erzeugen zu können, müssen der Proteinkomplex bzw. die Untereinheiten in guter Reinheit isoliert werden. Als Ausgangsmaterial für eine CF_0 -Präparation bietet sich isolierter CF_1 - CF_0 -Komplex an, da in ihm CF_0 bereits hoch angereichert ist und dann nur noch eine Methode zur Dissoziation von CF_1 - CF_0 in CF_1 und CF_0 entwickelt werden muß, vielleicht angelehnt an beschriebene F_0 -Isolierungen aus *E. coli* F_1 - F_0 (90, 91) oder TF_1 - TF_0 (83). Eine zweite Möglichkeit wäre die Extraktion von CF_0 aus EDTA-behandelten Membranen, z.B. mittels Cholat (122). Dieser Weg, der also zuerst die Entfernung des CF_1 vom noch in der Membran verbleibenden CF_0 und erst danach die Extraktion des CF_0 mit Hilfe eines Detergenzes vorsieht, führt aber nur zu stark kontaminierten Präparaten (122), die für Immunisierungen nicht geeignet sind. Es erschien mir daher erfolgversprechender, den CF_0 aus CF_1 - CF_0 -Komplex zu isolieren.

Die kurz vor dem Beginn der experimentellen Phase der vorliegenden Dissertation veröffentlichte Methode zur Isolierung von homogenem CF_1 - CF_0 (86) erwies sich in meinen Händen anfangs als nicht reproduzierbar, wohl nicht zuletzt deshalb, weil die Extraktionsbedingungen (Detergenz-, Chl-, Puffer- und Salzkonzentrationen) aufgrund unklarer Formulierungen in der Methodenbeschreibung nicht zu ermitteln waren. Da eigenen Extraktions-Experimenten mit der von PICK & RACKER (86) eingeführten Detergenzkombination Cholat/Octylglucosid wegen der hohen Kosten (Octylglucosid) Grenzen gesetzt waren, sah ich mich gezwungen, eine neue Methode zur Isolierung des CF_1 - CF_0 -Komplexes zu entwickeln, um so zu dem Ausgangsmaterial für eine CF_0 -Isolierung zu kommen.

1.1. Immunpräzipitation von CF_1 - CF_0 -Komplex aus Triton X-100-Extrakten

Das CF_1 -Antikörper-Immunpräzipitat von in Triton X-100 solubilisierten Thylakoidmembranen wies in der SDS-PAGE auf 12,5 %

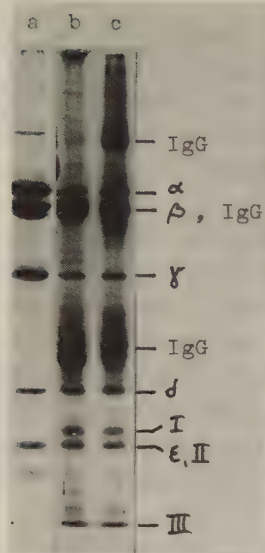
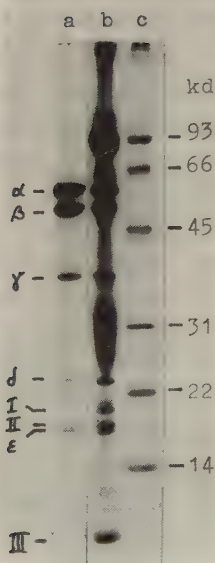


Abb. 1: Immunpräzipitation des CF_1 - CF_0 -Komplexes aus in Triton X-100 gelösten Thylakoiden mit CF_1 -Antikörpern. 0,6 ml Thylakoide (1 mg Chl/ml) in 2 % Triton X-100, 5 mM Tricin-NaOH pH 8, 5 mM NaCl wurden mit 0,2 ml AS 150-4 (Anti-Spinat- CF_1) 26 h bei 4 °C inkubiert, das Präzipitat 1 x mit 1 ml 5 mM Tris-SCo pH 7,3, 0,1 % Triton X-100 gewaschen und in 240 μl Proteinlösungsgemisch (Kap. VIII.11.) gelöst.
a: CF_1 (Spinat)
b: Immunpräzipitat CF_1 - CF_0 (5 min, 100° C)
c: Immunpräzipitat CF_1 - CF_0
SDS-PAGE: 12,5 % Acrylamid



Acrylamidgelen (ohne Harnstoff) neben den 5 CF_1 - und den IgG-Untereinheiten noch zwei weitere prominente Banden auf (Abb. 1). Auf einem 13-18 % Acrylamid-Gradientengel, welches 2,5 M Harnstoff enthielt, konnte neben den CF_0 -Untereinheiten I und III noch eine weitere, im Gelsystem ohne Harnstoff mit ϵ komigrierende CF_0 -Untereinheit (II) aufgelöst werden (Abb. 2). Die aus Abb. 2 abgeleiteten Molekulargewichte für die CF_1 -Untereinheiten betragen 59, 53, 37, 22 bzw. 16,5 kd, die für die CF_0 -Untereinheiten 19,5, 17,5 bzw. 10 kd. Das Peptidmuster des immunpräzipitierten CF_1 - CF_0 -Komplexes stimmt somit weitgehend - lediglich die vierte nach PICK & RACKER (86) mit δ komigrierende CF_0 -Untereinheit (im Gelsystem ohne Harnstoff) kann nicht sicher identifiziert werden - mit der von PICK & RACKER (86) veröffentlicht-

Abb. 2: Immunpräzipitation des CF_1 - CF_0 -Komplexes aus in Triton X-100 gelösten Thylakoiden. Bedingungen ähnlich wie in Abb. 1; statt AS 150-4 wurde das ebenfalls monospezifische CF_1 -Antiserum 155-3 verwendet.
a: CF_1 (Spinat)
b: Immunpräzipitat CF_1 - CF_0
c: Eichproteine

SDS-PAGE: 13-18 % Acrylamid-Gradient, 2,5 M Harnstoff

Untereinheitenzusammensetzung für CF_1 - CF_0 überein. CF_1 und CF_0 liegen also in Triton X-100 solubilisierten Thylakoidmembranen noch als CF_1 - CF_0 -Komplex vor. Selbst wenn die AS-Zugabe zu den in Triton X-100 gelösten Thylakoidmembranen erst nach 48 h erfolgte, wies das Immunpräzipitat zumindest qualitativ noch die gleiche Peptidzusammensetzung auf, wie die in Abb. 1 und 2 gezeigten Präzipitate. Offenbar bewirkt auch längeres Verbleiben des CF_1 - CF_0 -Komplexes in Lösungen mit hoher Triton X-100-Konzentration keine auffällige Dissoziation des Komplexes. Da Triton X-100 ein neutrales Detergenz ist, interferiert es nicht mit Ionenaustauschern und erlaubt eine Ionenaustauscher-Chromatographie als Reinigungsschritt. Diese Eigenschaften und nicht zuletzt der niedrige Preis ließen Triton X-100 als geeignetes Detergenz für eine CF_1 - CF_0 -Extraktion aus Spinat-Chloroplasten erscheinen.

1.2. Optimierung der CF_1 - CF_0 -Extraktion

In Vorversuchen, in denen der Einfluß von Chlorophyll- und Triton X-100-Konzentration beim Solubilisieren der Thylakoidmembranen in Gegenwart von 3 mM $MgCl_2$ auf die mittels EID gemessene CF_1 -Ausbeute im Extrakt untersucht wurde, konnte unter bestimmten Bedingungen eine starke Anreicherung von CF_1 bezogen auf Chl festgestellt werden (Tab. I). Durch Präzipitationsanalysen wurde abgesichert, daß in den Überständen nach Zentrifugation der Suspension noch CF_1 - CF_0 -Komplex vorlag. Die gemessene CF_1 -Rocketlänge kann daher in erster Näherung als Maß für CF_1 - CF_0 -Komplex herangezogen werden. Bei einer Chlorophyll-Konzentration von 0,25 mg/ml und 0,25 % Triton X-100 wurden bei fast vollständiger CF_1 - CF_0 -Extraktion sogar nur 13 % des Chlorophylls im Überstand (Extrakt) wiedergefunden. Durch Entfernung eines großen Teils der Chl-Proteine läßt sich also bereits eine beträchtliche CF_1 - CF_0 -Anreicherung (auf Chl-Basis) beim Extraktionsschritt erzielen. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß der auf Chlorophyll bezogene CF_1 - CF_0 -Anreicherungsfaktor von der $MgCl_2$ -Konzentration bei der Extraktion abhängig war. Durch Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration von 0,5 mM auf 10,5 mM konnte der Chlorophyllgehalt des Extraktes bei konstant bleibendem CF_1 -Gehalt von 65 auf 15 % abgesenkt werden. In Abwesenheit von $MgCl_2$ konnte keine CF_1 -An-

Chl (mg/ml)	Triton X-100 (% w/v)	Chl Überstand (%)	CF ₁ im Überstand (%)	Anreicherung (% CF ₁ :% Chl)
1	1,5	33	61	1,9
1	1,0	18	55	3,1
1	0,5	8	49	6,2
1	0,25	4	26	6,5
0,75	1,5	63	68	1,1
0,75	1,0	27	68	2,5
0,75	0,5	13	68	5,3
0,75	0,25	4	41	10,2
0,5	1,5	89	77	0,9
0,5	1,0	58	68	1,2
0,5	0,5	17	68	4,0
0,5	0,25	8	63	7,9
0,25	1,5	104	94	0,9
0,25	1,0	98	97	1,0
0,25	0,5	50	100	2,0
0,25	0,25	13	94	7,5
0,5	3,0	100	100	1

Tab. I: Optimierung der Extraktionsbedingungen. Isolierte Lamellarsysteme (VIII.3.) wurden bei den angegebenen Chl- und Triton X-100-Konzentrationen in 50 mM Saccharose, 12,5 mM Tricin-NaOH pH 8, 3 mM MgCl₂, 0,75 mM KCl 5 min bei RT inkubiert, abzentrifugiert (20 min, 35000 xg) und in den Überständen die Chlorophyllkonzentration und der CF₁-Gehalt durch EID bestimmt. Die unterschiedlichen Triton X-100-Konzentrationen wurden für die EID auf 3 % angeglichen. Der CF₁-Gehalt von Thylakoiden, die in Abwesenheit von MgCl₂ bei 0,5 mg Chl/ml und 3 % Triton aufgelöst worden waren (letzte Zeile), wurde gleich 100 % gesetzt (30 mm Rocket/3 µg Chl).
EID: 12,5 µl AS 152-t/10 ml Gel

reicherung beobachtet werden, der gelöste Chlorophyll-Anteil korrelierte mit der solubilisierten CF₁-CF₀-Menge (88). NaCl und Ammoniumsulfat (10 mM) hatten keinen Einfluß auf das CF₁:Chl-Verhältnis des Triton X-100-Extraktes, CaCl₂ konnte MgCl₂ ersetzen. Offenbar bewirken nur zweiwertige Kationen in dem getesteten Konzentrationsbereich einen signifikanten Effekt. Bei geeigneter Wahl von Chl-, Triton X-100- und MgCl₂-Konzentration kann also ein Extrakt hergestellt werden, der bei sehr

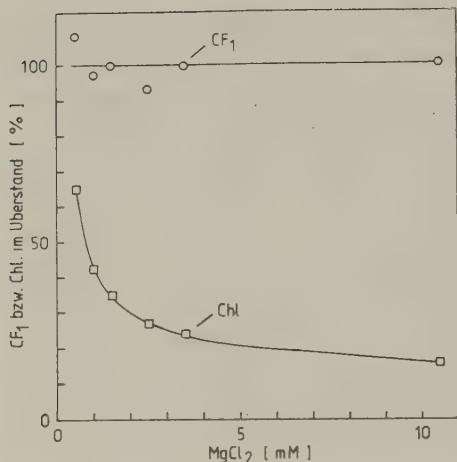


Abb. 3: Abhängigkeit der solubilisierten Chl- und CF₁-CF₀-Menge von der MgCl₂-Konzentration. Isolierte Lamellarsysteme wurden bei 1 % Triton X-100, 0,75 mg Chl/ml und den angegebenen MgCl₂-Konzentrationen wie in Tab. I beschrieben inkubiert und weiter behandelt. CF₁-Bestimmung durch EID wie in Tab. I.

Anmerkung: Im Gegensatz zu dem in Tab. I gezeigten Ergebnis wurden in diesem Experiment 100 % CF₁ im Überstand gemessen. Dies mag auf eine Fehlbestimmung des Bezugswertes zurückzuführen sein, der mit 23,25 mm CF₁-Rocket/3 µg Chl unter den angegebenen Bedingungen relativ niedrig lag.

niedrigem Chlorophyll-Gehalt noch 100 % der ursprünglichen CF₁-CF₀-Menge enthält und ohne Probleme auf eine Ionenaustauscher-Säule aufgetragen werden kann (siehe 1.3.).

1.3. Isolierung von CF₁-CF₀-Komplex durch Triton X-100-Extraktion, Anionenaustauscher-Chromatographie und Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Nach Methode VIII. 3. isolierte Lamellarsysteme (60 mg Chl) werden bei einer Chlorophyll-Konzentration von 0,6 mg/ml in 20 mM Tris-SO₄ pH 7,7, 0,1 mM MgCl₂ suspendiert. Wird eine besonders "saubere" CF₁-CF₀-Präparation angestrebt, so empfiehlt es sich, die Lamellarsysteme nach dem Schocken in 10 mM NaCl durch Resuspension und Zentrifugation mehrmals zu waschen. 30 mM Tris-SO₄ pH 8,2, 10 mM Tricin-NaOH pH 8,2, 150 mM NaCl erwies sich als geeigneter Waschpuffer und bewirkte eine deutliche Verringerung der Kontaminationen des isolierten CF₁-CF₀-Komplexes. Die gewaschenen Membranen werden in 20 mM Tris-SO₄ pH 7,7, 0,1 mM MgCl₂ resuspendiert und auf 0,6 mg Chl/ml eingestellt. Durch Zugabe des gleichen Volumens 0,5 % Triton X-100, 20 mM Tris-SO₄ pH 7,7, 10 mM MgCl₂ zu der Chloroplastensuspension wird die Chlorophyll-Konzentration auf 0,3 mg/ml erniedrigt

und 20 min im Eisbad gerührt. Die Suspension (0,25 % Triton) wird dann 30 min in der Ultrazentrifuge bei 150000 xg zentrifugiert. Der klare grüne Überstand wird gesammelt, durch Zugabe von 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -NaOH pH 7,7 auf 60 mM Ammoniumsulfat gebracht und dann auf eine mit 0,25 % Triton X-100, 20 mM Tris- SO_4 pH 7,7 5 mM MgCl_2 , 60 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -NaOH pH 7,7 (0,25 % -20-5-60) äquilibrierte DEAE-Sepharose CL-6B-Säule (2,5 cm $\varnothing$ x 5 cm) aufgetragen. Nach Waschen mit vier Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer wird mit 0,25 % -20-5-250 eluiert. Die Peak-Fractionen werden vereinigt (ca. 20 ml) und in einer Druckzelle auf einem AMICON XM 100-Filter mit 3 bar N_2 bei 4° C auf etwa 1 ml konzentriert.

Je 0,3 ml des meist leicht gelben Konzentrats werden nun auf Sucrose-Dichtegradienten aufgeschichtet, die aus einem 12-40 %igen linearen Sucrose-Gradienten (7 ml) und je 1,4 ml 12, 9,5 und 7 % Sucrose bestehen. Die Sucrose-Lösungen enthalten 0,2 % Triton X-100 (alternativ 0,4 % Na Cholat), 30 mM Tris-Succinat pH 6,5, 0,1 % beschallte Lipide (86). Die Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation wird über Nacht (ca. 18 h, 4° C) im SW 41-Rotor bei 200000 xg durchgeführt. Die Fraktionierung der Sucrose-Gradienten erfolgte durch Absaugen mittels Schlauchpumpe von oben. Etwa 15 Fraktionen à 0,7 ml werden gesammelt, in flüssigem N_2 eingefroren und bei -20° C gelagert.

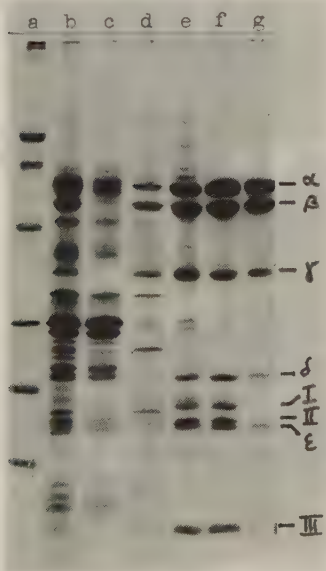


Abb. 4: Reinigung von CF_1 - CF_0 -Komplex durch Triton X-100-Extraktion, Ionenaustauscher-Chromatographie und Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation. Analyse der verschiedenen Fraktionen durch SDS-PAGE.
a: Eichproteine
b: gewaschene Thylakoide
c: Ultrazentrifugationssediment
d: Ultrazentrifugationsüberstand
e: Eluat der DEAE-Sepharose CL-6B-Säule
f: CF_1 - CF_0 nach Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation
g: CF_1 (Spinat)
SDS-PAGE: 13-18 % Acrylamid-Gradient, 2,5 M Harnstoff

Abb. 4 zeigt, daß der Ultrazentrifugationsüberstand (Extrakt) neben den auf dem SDS-Gel eindeutig zu identifizierenden CF_1 -Untereinheiten α , β und γ noch eine beträchtliche Anzahl kontaminierender Peptide enthielt. Mit Hilfe monospezifischer Antisera konnten Carboxydismutase (CDM), Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (FNR), Plastocyanin (Pc) und die durch Tris-Behandlung von inside-out-Vesikeln ablösbaren Peptide der Molekulargewichte 34, 23 bzw. 16 kd (2) nachgewiesen werden. Das Eluat der DEAE-Sephrose CL-6B-Säule enthielt dagegen neben dem bereits hoch angereicherten CF_1 - CF_0 -Komplex nur noch größere Verunreinigungen an CDM, FNR und Pc sowie relativ geringe Mengen an LHCP und einigen anderen, nicht identifizierten Peptiden.

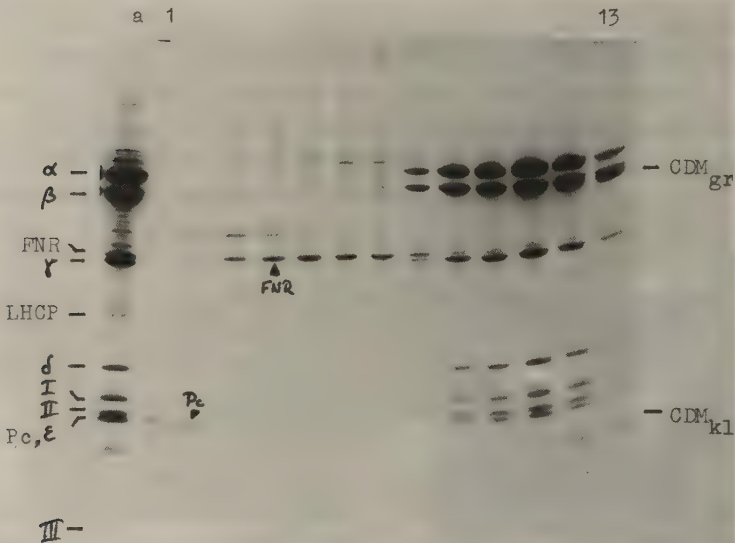


Abb. 5: Reinigung des Eluats der DEAE-Sephrose CL-6B-Säule durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation. Analyse der Fraktionen durch SDS-PAGE.

a: Eluat der DEAE-Sephrose CL-6B-Säule, verdünnt. 1-13: Fraktionen 1 bis 13 des Sucrose-Dichtegradienten. Bedingungen wie im Text angegeben. Probenvolumen jeweils 25 μ l.
SDS-PAGE: 13-18 % Acrylamid-Gradient, 2,5 M Harnstoff

Durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation konnten die meisten dieser Verunreinigungen vollständig - FNR und CDM zu einem großen Teil - vom CF_1 - CF_0 -Komplex abgetrennt werden (Abb. 4 u. 5). Die Fraktionen 9 und 10 des in Abb. 5 analysierten Sucrose-Dichtegradienten enthielten fast homogenen CF_1 - CF_0 -Komplex, der nur noch durch geringfügige Mengen eines knapp über γ laufenden Peptids (FNR ?) kontaminiert wurde. Der nach der von mir entwickelten Methode isolierte CF_1 - CF_0 -Komplex wies zumindest qualitativ die gleiche Untereinheitenzusammensetzung auf wie nach PICK & RACKER (86) mit Cholat/Octylglucosid extrahierter CF_1 - CF_0 -Komplex (VIII. 17.) bzw. wie immunpräzipitierter CF_1 - CF_0 -Komplex (Abb. 6).

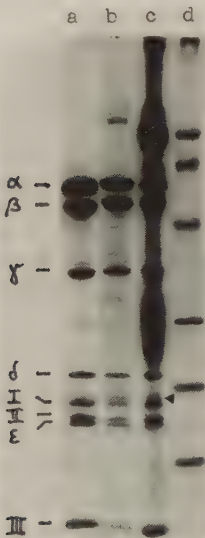


Abb. 6: Untereinheitenzusammensetzung von mit Triton X-100 bzw. Cholat/Octylglucosid extrahierten CF_1 - CF_0 -Präparaten sowie immunpräzipitiertem CF_1 - CF_0 -Komplex. Analyse der verschiedenen Präparate durch SDS-PAGE.
a: CF_1 - CF_0 -Komplex (Triton X-100) nach Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation
b: CF_1 - CF_0 -Komplex (Cholat/Octylglucosid) nach Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation
c: Immunpräzipitat CF_1 - CF_0 , identisch mit dem in Abb. 2 gezeigten Präparat
d: Eichproteine
SDS-PAGE: 13-18 % Acrylamid-Gradient, 2,5 M Harnstoff

Tab. II zeigt die Chlorophyll- und Protein-Bilanz einer CF_1 - CF_0 -Präparation. Etwa ein Viertel des Thylakoidmembran-Proteins wurde unter den beschriebenen Extraktionsbedingungen solubilisiert, nur 6 % des

Chlorophylls konnte durch den Ultrazentrifugationsschritt nicht sedimentiert werden. Ungefähr ein Drittel des auf die DEAE-Säule aufgetragenen Proteins fand sich in der CF_1 - CF_0 -haltigen Fraktion wieder und war praktisch frei von Chlorophyll.

Fraktion	Chl a+b (mg)	Chl a a/b	Protein	
			(mg)	(%)
Chloroplasten	265	2,99	1224	100
Ultrazentrifugations- sediment	245	2,84	780	64
Ultrazentrifugations- überstand	16	5,49	278	23
Eluat der DEAE-Sepharose CL-6B-Säule	Spuren	-	102	8

Tab. II: Chlorophyll- und Protein-Bilanz einer CF_1 - CF_0 -Präparation. Abweichend von der im Text beschriebenen Methode wurde eine DEAE-Sepharose CL-6B-Säule von 2,5 cm Ø und 12 cm Höhe benutzt. Für die Proteinbestimmung wurden Aliquots der Fraktionen mit 80 % Aceton extrahiert und die präzipitierten Proteine in 3 % SDS wieder gelöst.

1.4. Rekonstitution des isolierten CF_1 - CF_0 -Komplexes in Liposomen

PICK & RACKER (86) konnten zeigen, daß mit Cholat/Octylglucosid extrahierter CF_1 - CF_0 -Komplex nach Rekonstitution in Liposomen ATP bilden konnte, wenn die Vesikel durch einen Säure-Base-Wechsel (55), d.h. durch einen artifiziellen pH-Gradienten, energisiert wurden. ^{32}P -ATP-Austausch-Aktivität eines in Liposomen rekonstituierten ATP-Synthase-Komplexes gilt ebenfalls als Indiz dafür, daß der isolierte Protein-Komplex noch die Eigenschaften des membrangebundenen Proteins beibehalten hat und zur ATP-Bildung fähig ist, obwohl bei diesem Test keine Netto-ATP-Bildung gemessen werden kann. Um zu untersuchen, ob der aus Triton X-100-Extrakt isolierte Komplex noch eine für intakten CF_1 - CF_0 charakteristische Aktivität besaß, wurde versucht, den in den Fraktionen eine Sucrose-Gradienten enthaltenen CF_1 - CF_0 -Komplex in Liposomen zu inkorporieren und ^{32}P -ATP-Austausch-Aktivität zu messen.

Nur die von OKAMOTO et al. (83) für TF_1 - TF_0 vorgestellte, z.B. auch für F_1 - F_0 aus *Rhodospirillum rubrum* erfolgreiche (92) Cholat/DOC-Dialysiermethode zur Inkorporation des isolierten Komplexes in Liposomen (Kap. VIII. 14.) führte zu rekonstitu-

iertem CF_1 - CF_0 -Komplex, der noch signifikante ^{32}P -ATP-Austausch-Aktivität aufwies. Abb. 7 zeigt, daß die Verteilung der ^{32}P -ATP-

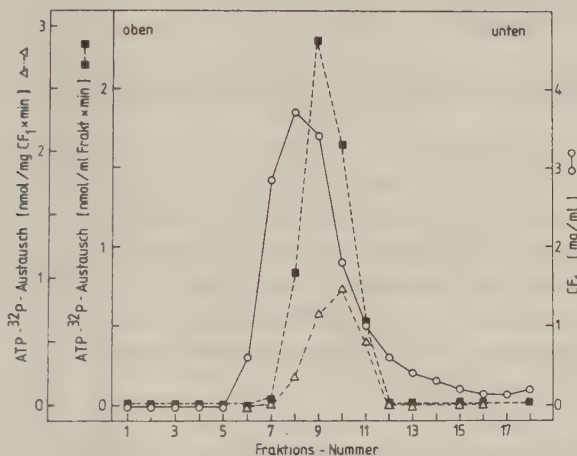


Abb. 7: ^{32}P -ATP-Austausch-Aktivität des in den Fraktionen eines Sucrose-Dichtegradienten (0,4 % Na-Cholat) enthaltenen CF_1 - CF_0 -Komplexes nach Rekonstitution. Je 0,2 ml der Fraktionen wurden zu 0,8 ml Lipidpuffer (40 mg Lipid) gegeben und wie in VIII.1. beschrieben weiterbehandelt. Die CF_1 -Konzentration wurde mittels EID bestimmt (Eichung mit homogenem CF_1 in Sucrose-Gradientenmedium). Die Fraktionen des Sucrose-Gradienten wurden für die EID in geeigneter Weise verdünnt. EID: 50 μ l AS 152-t/10 ml Gel.

Austausch-Gesamtaktivität nicht mit der CF_1 -Verteilung im Sucrose-Gradienten Übereinstimmte, die Aktivitätskurve war gegenüber der CF_1 -Kurve um eine Fraktion zu höherem Sucrosegehalt hin verschoben. Die auf CF_1 bezogene sogenannte CF_1 -spezifische Austausch-Aktivität wies somit ebenfalls einen vom CF_1 -Gehalt verschiedenen Verlauf auf. Die gemessenen Aktivitäten von weniger als 1 nmol ^{32}P -ATP-Austausch x mg CF_1 ⁻¹ x min⁻¹ sind gegenüber den von PICK & RACKER (86) für mit Cholat/Octylglucosid extrahiertem CF_1 - CF_0 -Komplex veröffentlichten 200-400 nmol ^{32}P -ATP-Austausch x mg Protein⁻¹ x min⁻¹ als äußerst gering zu bezeichnen. HAUSKA et al. (46) berichteten allerdings, daß mit nach PICK & RACKER (86) isoliertem Komplex trotz sorgfältiger Optimierung der Methode nicht mehr als 15-35 nmol x mg Protein⁻¹

x min⁻¹ erreicht werden konnten.

Es wurde kein Versuch unternommen, den möglicherweise nicht optimalen Aktivitätstest zu verbessern.

2. Isolierung der Proteolipid-Untereinheit des CF₀-Komplexes

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kann die CF₀-Untereinheit III, das an der H⁺-Translokation beteiligte DCCD-bindende Proteolipid, mittels organischer Lösungsmittel aus Chloroplasten extrahiert werden (100, 103). Da die CF₀-Untereinheiten-Präparation ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, wurde versucht, das Proteolipid in einer für mehrere Immunisierungen ausreichenden Menge durch Extraktion von Thylakoidmembranen bzw. isoliertem CF₁-CF₀-Komplex zu reinigen.

2.1. Proteolipid-Isolierung aus Thylakoidmembranen

Isolierte Lamellarsysteme - auch EDTA-behandelte Membranen sind verwendbar - werden abzentrifugiert und das Sediment in Chloroform/Methanol/Diäthyläther (C/M/Ä) 2:1:12 homogenisiert und 5 min bei RT kräftig gerührt (1-2 mg Chl/ml). Nach Zentrifugation (HETTICH, 5 min, 4° C) wird die Wasserphase (unten) mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Die organische Phase und die Interphase werden wieder homogenisiert und nach Zugabe des gleichen Volumens C/M/Ä 2:1:12 weitere 15 min bei RT gerührt. Danach läßt man das auspräzipitierte Protein im Meßzylinder absitzen und saugt den dunkelgrünen Überstand ab. Das Protein wird solange mit C/M/Ä 2:1:12 gewaschen, bis das Chlorophyll vollständig extrahiert ist. Nach SIGRIST-NELSON et al. (103) wird das Proteolipid bei diesem Extraktionsschritt zur Entfernung von Chlorophyll und Lipiden nicht entfernt. Das so gewaschene Präzipitat wird nach Abzentrifugation in Chloroform/Methanol 2:1 resuspendiert und 60 h bei 4° C gerührt. Danach wird das Protein abzentrifugiert, der Überstand durch eine Glasfritte filtriert und dann am Rotationsverdampfer eingedampft (30° C). Durch sorgfältiges Spülen des Kolbens mit mehreren Portionen 20 mM Tris-SO₄ pH 8, 2 % SDS, 10 % Glycerin wird das isolierte Proteolipid wieder in Lösung gebracht. Ausgehend von Chloro-

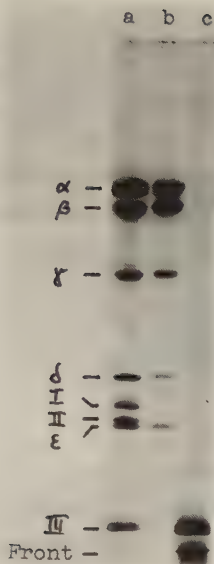


Abb. 8: Isolierung der Proteolipid-Untereinheit des CF_0 -Komplexes aus isolierten Lamellarsystemen durch Extraktion mit C/M 2:1. Analyse durch SDS-PAGE.

a: CF_1 - CF_0 -Komplex (Triton X-100)

b: CF_1 (Spinat)

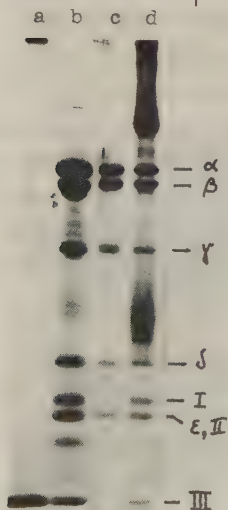
c: Proteolipid (ca. 30 μ g Protein)

SDS-PAGE: 13-18 % Acrylamid-Gradient, 2,5 M Harnstoff

plasten entsprechend 225 mg Chlorophyll konnten 14,4 mg Lowry-Protein isoliert werden. Dies entsprach einer Ausbeute von 64 μ g Protein pro mg Chl. Neben einer schwachen, niedermolekularen Verunreinigung (ca. 10 kd) konnte durch SDS-PAGE des Proteolipid-Präparates an der Lauffront des SDS-Gels noch mit Coomassie anfärbbares Material nachgewiesen werden (Abb. 8).

2.2. Proteolipid-Extraktion aus isoliertem CF_1 - CF_0 -Komplex

Isolierter CF_1 - CF_0 -Komplex (Eluat der DEAE-Sepharose CL-6B-Säule,



Kap. 1.3.) wird durch Zugabe einer konzentrierten Na-Cholat-Stammlösung auf 1 % Na-Cholat gebracht (105) und mit festem $(NH_4)_2SO_4$ (0,25 mg/ml) gefällt. Das präzipitierte Protein wird abzentrifugiert (10 min, 17000 xg), in etwa 20 ml C/M 2:1 resuspendiert und 20 h bei 4° C gerührt. Wie in 2.1. beschrieben wird das in C/M 2:1 gelöste Proteolipid dann weiterbehandelt.

Abb. 9: Isolierung der Proteolipid-Untereinheit des CF_0 -Komplexes aus isoliertem CF_1 - CF_0 -Komplex durch Extraktion mit C/M 2:1. Analyse durch SDS-PAGE.

a: Proteolipid aus isoliertem CF_1 - CF_0 -Komplex

b: CF_1 - CF_0 -Komplex (Triton X-100)

c: CF_1 (Spinat)

d: Immunpräzipitat CF_1 - CF_0 (siehe Abb. 1)

SDS-PAGE: 13,5 % Acrylamid

Abb. 9 zeigt, daß das so isolierte Proteolipid-Präparat keine durch SDS-PAGE nachweisbaren Verunreinigungen mehr enthielt. Da mit dieser Methode aus 20 mg CF_1 - CF_0 -Rohpräparat nicht mehr als 0,2-0,4 mg Proteolipid isoliert werden konnte, wurde sie für die Präparation von Proteolipid für Immunisierungen nicht eingesetzt. Statt des mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällten CF_1 - CF_0 -Komplexes kann auch immunpräzipitierter CF_1 - CF_0 -Komplex als Ausgangsmaterial verwendet werden (110).

3. Herstellung und Charakterisierung von CF_1 - CF_0 - bzw. CF_0 -Antisera

Alle Versuche, den CF_0 -Komplex aus CF_1 - CF_0 -Präparaten zu isolieren, schlugen fehl. Es gelang nicht, die für TF_0 -Isolierung aus TF_1 - TF_0 beschriebene - auch für EF_0 -Isolierung erfolgreiche (90) - Harnstoffbehandlung (83) auf CF_1 - CF_0 zu übertragen. Versuche, den CF_1 - CF_0 -Komplex durch EDTA-Behandlung zu dissoziieren, waren ebenfalls erfolglos. Die Isolierung der CF_0 -Untereinheiten I und II, z.B. durch präparative Gelelektrophorese, wurde nicht in Angriff genommen, da wegen der engen Nachbarschaft der Untereinheiten δ , I, II und ϵ ein "sauberes" Ausschneiden der CF_0 -Untereinheiten aus SDS-Gelen sehr schwierig erschien.

Um dennoch zu CF_0 -Antisera zu gelangen, mußte also die Strategie geändert werden. Es wurden nun Kaninchen mit isoliertem bzw. immunpräzipitiertem CF_1 - CF_0 -Komplex immunisiert, in der Hoffnung, daß die Kaninchen neben den sicherlich zu erwartenden Antikörpern gegen CF_1 auch Antikörper gegen den CF_0 produzieren würden. Die CF_1 -Antikörper sollten dann durch Neutralisation mit den auch in größeren Mengen relativ einfach zu isolierenden CF_1 (Kap. VIII.6.) aus den CF_1 - CF_0 -Antisera entfernt werden.

3.1. Herstellung und Charakterisierung von Antisera gegen isolierten CF_1 - CF_0 -Komplex

Mit einem durch Triton X-100-Extraktion, Ionenaustauscher-Chromatographie und Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigten CF_1 - CF_0 -Komplex (Kap. III.1.3.) wurden zwei Kaninchen (Nr. 169 und 170) immunisiert. Das verwendete Präparat enthielt

neben dem CF_1 - CF_0 -Komplex noch geringe Verunreinigungen an FNR und anderen, nicht identifizierten Peptiden. Für Primär- und Booster-Injektion wurden jeweils 1 mg Protein pro Kaninchen verwendet (Kap. VIII.12.).

Beide CF_1 - CF_0 -Antisera enthielten die erwarteten und im Ouchterlony-Test (Abb. 10) die Hauptpräzipitationslinie bildenden

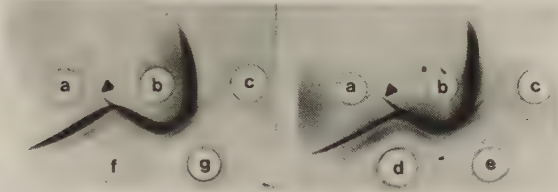


Abb. 10: Spezifitäts-Analyse der CF_1 - CF_0 -Antisera durch Ouchterlony-Immendiffusion.
a: CF_1 (1 mg/ml in 3 % Triton X-100) b: CF_1 - CF_0 (1 mg/ml in 3 % Triton X-100) c: AS 152-t (anti- CF_1) d: AS 169-3 (anti- CF_1 - CF_0) e: AS 169-4 (anti- CF_1 - CF_0) f: AS 170-2 (anti- CF_1 - CF_0) g: AS 170-3 (anti- CF_1 - CF_0). Probenvolumen: c 12 μ l, sonst 6 μ l

CF_1 -Antikörper, die durch die Identitätslinien mit einem monospezifischen Antiserum gegen CF_1 sicher identifiziert werden konnten. Die in Abb. 10 als Sporn erscheinende Präzipitationslinie (Pfeil) erwies sich als eine vollkommen separate Präzipitationslinie (Abb. 11), die bei dem in Abb. 10 gezeigten Ouchterlony Test nur zufällig auf der CF_1 -Präzipitationslinie lag.

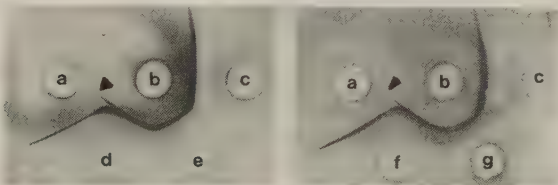


Abb. 11: Spezifitäts-Analyse der CF_1 - CF_0 -Antisera durch Ouchterlony-Immendiffusion.
a - g: wie in Abb. 10 b: zusätzlich 6 μ l CF_1 (1mg/ml in 3 % Triton X-100), um die CF_1 -Präzipitationslinien gegenüber den anderen Präzipitationslinien zu verschieben.

Es lag nahe anzunehmen, daß diese Präzipitationslinie durch CF_0 -Antikörper verursacht wurde. Das Auftreten von separaten CF_1 - und

CF_0 -Präzipitationslinien ohne jegliche Spornbildung - partielle Identität von CF_1 und CF_1 - CF_0 -Komplex gegenüber einem CF_1 - CF_0 -Antiserum war erwartet worden - Überraschte zunächst und kann nur durch vollständige Dissoziation des CF_1 - CF_0 -Komplexes in CF_1 und CF_0 - unter den beim Ouchterlony-Test herrschenden Bedingungen - erklärt werden. Neben den CF_0 - und CF_1 -Präzipitationslinien trat in der Immundiffusion noch eine weitere, schwache Linie auf (Abb. 10 u. 11), die, wie mit Hilfe eines monospezifischen Antiserums gegen FNR festgestellt werden konnte, durch im CF_1 - CF_0 -Antiserum vorhandene FNR-Antikörper verursacht wurde (nur für AS 170-2 gezeigt, Abb. 12).

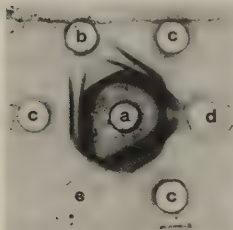


Abb. 12: Ouchterlony-Test mit in Triton X-100 gelösten Kontroll-Chloroplasten

a: Kontroll-Chloroplasten (1 mg Chl/ml in 3% Triton X-100)
b: AS 152-t (anti- CF_1)
c: AS 170-2 (anti- CF_1 - CF_0)
d u. e: AS 160-6 (anti-FNR)
Probenvolumen: a 12 μ l, e 3 μ l, sonst 6 μ l

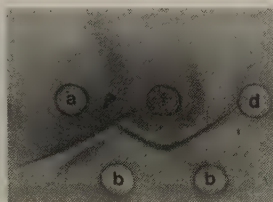
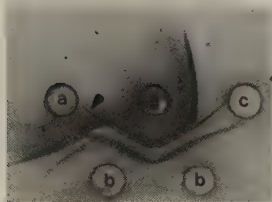


Abb. 13: Ouchterlony-Test mit in Triton X-100 gelösten Kontroll- und EDTA-behandelten (2x) Chloroplasten.

a: CF_1 (1 mg/ml in 3 % Triton X-100) b: AS 170-2 (anti- CF_1 - CF_0)
c u. d: AS 152-t (anti- CF_1) e: Kontroll-Chloroplasten (1 mg Chl/ml in 3 % Triton X-100) f: EDTA-behandelte (2x) Membranen (1 mg Chl/ml) Probenvolumen: e u. f je 12 μ l, d 3 μ l, sonst 6 μ l

Als ein Hinweis für die Richtigkeit der Hypothese, daß die CF_1 - CF_0 -Antiseren tatsächlich präzipitierende CF_0 -Antikörper enthalten, konnte das Ergebnis des in Abb. 13 dargestellten Experimentes gewertet werden. CF_0 als vermutlich membranintegrales und nur durch Detergenzien in Lösung zu bringendes Protein kann durch EDTA-Behandlung nicht von der Membran entfernt werden. In der

Tat war das in den mit Pfeilen markierten Linien präzipitierte Protein (Abb. 13) - dies kann aus Position und Intensität der mit Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Membranen erhaltenen Präzipitationslinien abgeschätzt werden - nicht durch EDTA-Behandlung extrahierbar, während alle anderen der vom AS 170-2 angezeigten Proteine (CF_1 , FNR) zumindest teilweise durch die zweimalige EDTA-Behandlung von der Thylakoidmembran abgelöst wurden.

3.2. Herstellung und Charakterisierung von Antiseren gegen immunpräzipitierten CF_1 - CF_0 -Komplex

Der mit Hilfe von CF_1 -Antikörpern aus in Triton X-100 solubilisierten Kontroll-Chloroplasten immunpräzipitierte CF_1 - CF_0 -Komplex eignete sich ebenso wie isolierter CF_1 - CF_0 -Komplex für die Herstellung von CF_1 - CF_0 -Antiseren, denn sorgfältig gewaschene CF_1 - CF_0 -Immunpräzipitate enthielten neben den dem CF_1 - CF_0 zugeordneten Untereinheiten und den IgG-Untereinheiten praktisch keine mit SDS-PAGE nachweisbaren Verunreinigungen (Abb. 2). Die antigenen Eigenschaften von Antigen-Antikörper-Komplexen scheinen in vielen Fällen gegenüber dem reinen Antigen keinesfalls verschlechtert, eher verbessert (60). Die Injektion von immunpräzipitiertem CF_1 - CF_0 in Kaninchen sollte daher wie die von isoliertem CF_1 - CF_0 das Immunsystem der Kaninchen zu Bildung von CF_1 und CF_0 -Antikörpern anregen. Da das zur CF_1 - CF_0 -Präzipitation verwendete CF_1 -Antiserum von Kaninchen stammte, sollten die im Präzipitat enthaltenen Immunglobuline keine antigenen Eigenschaften besitzen.

Durch Zugabe von 4,5 ml AS 155-3 (anti- CF_1) zu in 1,8 % Triton X-100 gelösten Thylakoidmembranen (16 mg Chl in 25 ml) wurde der CF_1 - CF_0 -Komplex unter den in Abb. 1 angegebenen Bedingungen präzipitiert. Das Antiserum zu Antigenverhältnis wurde so gewählt, daß das Antigen (CF_1) quantitativ auspräzipitierte. Nach 3 maligem Waschen des Präzipitats (siehe Abb. 1) wurde es in 150 mM NaCl suspendiert. Die Reinheit des immunpräzipitierten CF_1 - CF_0 -Komplexes wurde durch SDS-PAGE überprüft (Abb. 2, Tasche b). Mit der isolierten Immunpräzipitat-Menge wurden 2 Kaninchen immunisiert (Nr. 186 und 187). Pro Kaninchen wurde jeweils ein Viertel der Präzipitatsuspension für die Primär- bzw. Boosterinjektion verwendet.

Sowohl das Kaninchen Nr. 186 als auch Nr. 187 produzierten neben Antikörpern gegen CF_1 auch noch Antikörper gegen ein weiteres, auch in hochgereinigtem CF_1 - CF_0 -Komplex (Fr. 10 des in Abb. 5 durch SDS-PAGE analysierten Präparates) enthaltenes Protein (Abb. 14, nur für Kaninchen Nr. 187 gezeigt).



Abb. 14: Spezifitätsanalyse eines Antiserums (187) gegen immunpräzipitierten CF_1 - CF_0 -Komplex durch Ouchterlony-Test. a: KS 187-0 b: EDTA-behandelte Chloroplasten (0,7 mg Chl/ml in 3 % Triton X-100) c: CF_1 (ca. 1 mg/ml in 40 mM Tricin pH 7,8, 2 mM EDTA) d: Kontroll-Chloroplasten (0,7 mg/ml in 3 % Triton X-100) e: homogener CF_1 - CF_0 (ca. 1,5 mg/ml in 3 % Triton X-100) f: CF_1 - CF_0 -Rohpräparat (nach DEAE-Säule, ca. 1 mg/ml in 3 % Triton X-100) g: AS 187 (anti- CF_1 - CF_0). Probenvolumen: b u. d 18 μ l, g 9 μ l, sonst 6 μ l

Da Antikörper gegen FNR, Pc und CDM nicht nachgewiesen werden konnten, lag es wiederum nahe anzunehmen, daß die mit Pfeil markierte Präzipitationslinie durch CF_0 -Antikörper verursacht wurde. Neben der mit Pfeil gekennzeichneten CF_0 - und der kräftigen CF_1 -Präzipitationslinie konnte noch eine dritte, schwache Linie gegen nahezu homogenen CF_1 - CF_0 beobachtet werden. Da diese Linie auch mit isoliertem CF_1 , der garantiert keinen CF_0 enthält, auftrat, kann ausgeschlossen werden, daß diese durch CF_0 -Antikörper verursacht wurde. Möglicherweise handelt es sich um präzipitierte CF_1 -Dissoziationsprodukte. Mit dem CF_1 - CF_0 -Rohpräparat konnte noch eine vierte Linie beobachtet werden. Welches Protein hier angezeigt wurde, konnte nicht geklärt werden.

3.3. Herstellung und Charakterisierung von CF_0 -Komplex-Antiseren

Die in 3.1. und 3.2. charakterisierten CF_1 - CF_0 -Antiseren eigneten sich natürlich noch nicht für die geplanten Untersuchungen zur Erreichbarkeit des CF_0 , da die von diesen Seren ausgeübten Effekte nicht zweifelsfrei auf CF_0 -Antikörpereinwirkung zurückgeführt werden könnten. Die in den Seren enthaltenen CF_1 -Antikörper müssen also möglichst vollständig entfernt werden. Ausreichende Zugabe von isoliertem CF_1 zu den CF_1 - CF_0 -Antiseren sollte zu einer

Neutralisation der CF_1 -Antikörper durch Antikörper-Antigen-Komplexbildung führen, aber nur bei einem bestimmten Antikörper-Antigen-Verhältnis (Äquivalenzzone) kann man durch Abzentrifugation der entstandenen Präzipitate eine vollständige Entfernung von Antikörpern und zugegebenem Antigen (CF_1) erreichen. Die Äquivalenzzone bei der Präzipitation kann durch Heidelberger-Titrationsen (47) ermittelt werden. Das Verfahren erschien jedoch zu aufwendig, da für jedes der verwendeten Antiseren bzw. verschiedenen Antiserum-Zapfungen mit vielleicht unterschiedlichen CF_1 -Antikörper-Titern die Heidelberger-Kurve mit dem jeweils zur Absorption eingesetzten CF_1 -Präparat bestimmt werden müßte. Es wurde deshalb die im folgenden Abschnitt beschriebene Methode entwickelt.

3.3.1. Absorption der CF_1 -Antikörper aus den CF_1 - CF_0 -Antiseren

Dem zu absorbierenden CF_1 - CF_0 -Antiserum (10 ml) wird in Portionen von 1 ml eine CF_1 -Lösung (2,5 mg Protein/ml) zugesetzt, bis eine durch Präzipitate verursachte starke Trübung des Antiserums zu beobachten ist (gewöhnlich nach 2-3 ml). Das verwendete, als Ammoniumsulfat-Suspension gelagerte CF_1 -Rohpräparat (Kap. VIII.6., Eluat der DEAE-Säule) wird dazu abzentrifugiert, in 40 mM Tricin-NaOH pH 7,8, 2 mM EDTA gelöst und braucht nicht entsalzt zu werden. Nach 30 min Inkubation auf Eis wird das Präzipitat abzentrifugiert und der Überstand erneut mit 1 ml CF_1 -Lösung versetzt, inkubiert und abzentrifugiert. Kann bei diesem Schritt noch ein abzentrifugierbares Präzipitat festgestellt werden, so wird nochmals 1 ml CF_1 -Lösung zugegeben und wie oben verfahren. Bereits nach Zugabe von insgesamt 4-5 ml CF_1 -Lösung zu 10 ml CF_1 - CF_0 -AS entsteht in den meisten Fällen kein Präzipitat mehr. Um den offenbar bereits im Überschuß zugegebenen CF_1 aus dem Antiserum zu entfernen - auch im Serum enthaltener CF_1 könnte bei einigen Tests stören - wird das Serum nun einer Gelfiltration auf Sephacryl S-300 unterzogen. Zur Verminderung des Probenvolumens wird das absorbierte Antiserum mit 10 mM Tricin-NaOH pH 7,8, 150 mM NaCl (10-150) auf 50 ml verdünnt und mit festem $(NH_4)_2SO_4$ (0,277 g/ml) bis 45 % Sättigung die IgG-Fraktion ausgefällt. Die präzipitierte IgG-Fraktion

wird abzentrifugiert (10 min, 17000 xg, 4° C) und der Überstand sorgfältig entfernt. Das Sediment wird in wenig 10-150 gelöst, in 3-4 Portionen zu etwa 1,2 ml eingeteilt und bei -20° C gelagert.

Jeweils eine Portion wird für die Gelfiltration auf einer mit 10-150 äquilibrierten Sephacryl-300-Säule (1,6 cm Ø x 75 cm) aufgetaut. Um auch die letzten eventuell noch vorhandenen CF₁-Antikörper zu neutralisieren, wird noch einmal 0,3 ml CF₁-Lsg. (ca. 5 mg Protein/ml) zugesetzt und 1 h bei RT inkubiert. Danach wird die in der Regel opaleszente Protein-Lösung 2 min in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt mit 10-150 bei einer Flußrate von 10 ml/h. Abb. 15 zeigt das Elutionsprofil einer typischen Präparation.

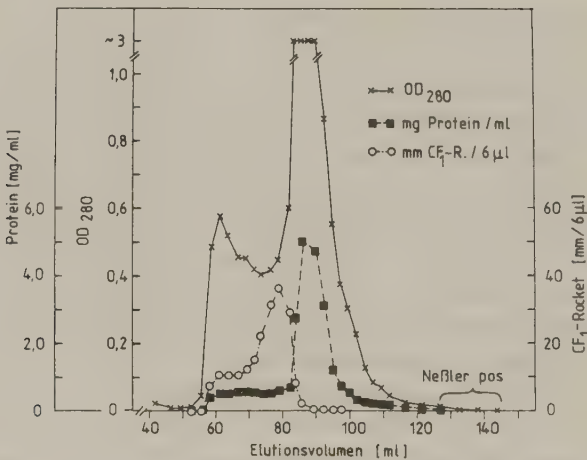


Abb. 15: Gelfiltration der durch (NH₄)₂SO₄-Fällung bis 45 % Sättigung angereicherten IgG-Fraktion aus dem mit CF₁ absorbierten CF₁-CF₂-Antiserum 169-4 auf Sephacryl-300. Der CF₁-Gehalt der Fraktionen wurde durch EID bestimmt. Die ammoniumsulfathaltigen Fraktionen wurden durch Test mit Neßler's Reagenz ermittelt. Weitere Bedingungen siehe Text. EID: 12,5 µl AS 152-4/10 ml Agarosegel

Durch die Gelfiltration konnte die die CF₀-Antikörper enthaltende IgG-Fraktion (bei 82 - 100 ml; Molekulargewicht ca. 160000) fast

vollständig vom überschüssigen CF_1 (Molekulargewicht ca. 330000), der bei etwa 67 bis 84 ml eluiert wurde, befreit werden. Wie die CF_1 -Rocketanalyse der Fraktionen zeigte, enthielten aber bereits die Fraktionen ab 58 ml (nahe am Ausschlußvolumen der Säule) CF_1 . Durch Ouchterlony-Analyse mit einem Antiserum gegen Kaninchen-IgG konnte festgestellt werden, daß in diesen Fraktionen Antikörper vorhanden waren. Vermutlich enthalten diese Fraktionen - wegen zu geringer Größe nicht abzentrifugierbare - Antigen-Antikörper-Aggregate unterschiedlicher Größe. Das durch die Ammoniumsulfat-Fällung eingeschleppte $(NH_4)_2SO_4$, welches bei ca. 130 ml eluierte, wurde durch die Gelfiltration vollständig von der IgG-Fraktion abgetrennt.

Die IgG-Fraktionen mehrerer Säulenläufe werden vereinigt und durch Druckfiltration (Kap. VIII.16.) auf ein Volumen konzentriert, welches das Ausgangsvolumen an Antiserum möglichst unterschreitet, in Portionen à 0,5 ml aufgeteilt und bei $-20^\circ C$ gelagert.

3.3.2. Charakterisierung der CF_0 -Antisera

Durch Ouchterlony-Analyse ließen sich in den nach der beschriebenen Methode mit CF_1 absorbierten CF_1 - CF_0 -Antisera keine CF_1 -Antikörper mehr nachweisen (Abb. 17). Vergleicht man die Präzipitationsmuster der CF_1 - CF_0 -Antisera vor und nach Absorption mit CF_1 - in dem in Abb. 17 gezeigten Test wurden entsprechende Mengen an absorbierten (gekennzeichnet durch den nachgestellten Buchstaben A) bzw. nicht-absorbierten Antisera eingesetzt -

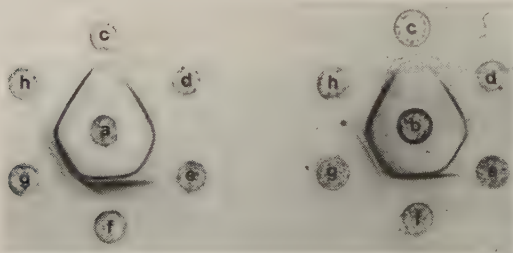


Abb. 16: Spezifitätsanalyse durch Ouchterlony-Test.

a: homogener CF_1 - CF_0 (ca. 1 mg/ml in 3 % Triton X-100) b: Kontroll-Chloroplasten (0,7 mg Chl/ml in 3 % Triton X-100) c: KS 187-0 d: AS 187-A (anti- CF_0) e: AS 169-3 A (anti- CF_0) f: AS 187 (anti- CF_1 - CF_0) g: AS 169-3

(anti- CF_1 - CF_0) h: AS 152-4 (anti- CF_1). Probenvolumen: a 18 μ l, h 3 μ l, sonst 6 μ l

so erkennt man, daß durch die Absorption mit dem CF_1 -Rohpräparat, welches u.a. auch Reduktase enthielt, nicht nur die CF_1 -Antikörper, sondern auch Antikörper gegen im CF_1 - CF_0 -Rohpräparat enthaltene Verunreinigungen entfernt werden konnten. Da auch ge-

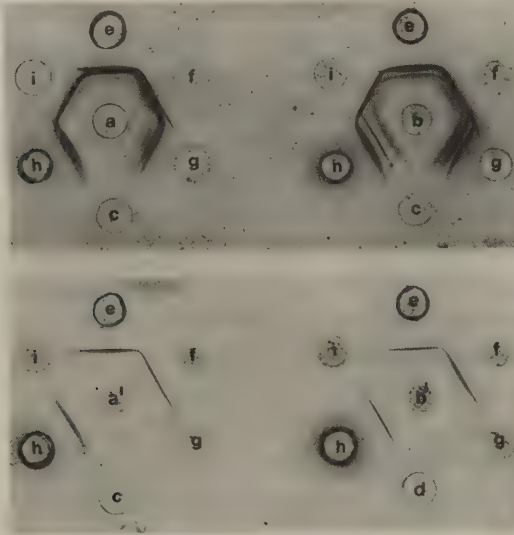


Abb. 17: Ouchterlony-Test zum Vergleich der Spezifitäten von mit CF_1 absorbierten CF_1 - CF_0 -Antisera und nicht-absorbierten CF_1 - CF_0 -Antisera.

- a: AS 187 (anti- CF_1 - CF_0)
- b: AS 169-3 (anti- CF_1 - CF_0)
- a': AS 187-A (AS 187, absorbiert mit CF_1)
- b': AS 169-3 A (AS 169-3, absorbiert mit CF_1)
- c: KS 187-0 d: KS 169-0
- e: Kontroll-Chloroplasten (0,7 mg Chl/ml in 3 % Triton X-100)
- f: homogener CF_1 - CF_0 (ca. 1,5 mg/ml in 3 % Triton X-100)
- g: CF_1 - CF_0 -Rohpräparat (nach DEAE-Säule, ca. 1 mg/ml in 3 % Triton X-100)
- h: EDTA-behandelte Chloroplasten (0,7 mg Chl/ml in 3 % Triton X-100)

i: CF_1 (ca. 1 mg/ml in 40 mM Tricin-NaOH pH 7,8, 2 mM EDTA).
 Probenvolumen: a 9 μ l, e u. h 18 μ l, sonst 6 μ l

gen CF_1 - CF_0 -Rohpräparate nur noch eine Präzipitationslinie erhalten wurde, sind die absorbierten Seren als monospezifisch zu bezeichnen. Wie die Identitätslinie in Abb. 16 eindeutig belegt, zeigten die mit CF_1 absorbierten Antisera gegen isolierten (AS 169-3 A) bzw. gegen immunpräzipitierten CF_1 - CF_0 -Komplex (AS 187-A) dasselbe Protein, nämlich CF_0 an.

Mit Hilfe der Kreuz-Immunelektrophorese nach CHUA (30) und der Immunoblottingmethode nach TOWBIN et al. (114) kann man demonstrieren, gegen welche Untereinheiten eines Proteinkomplexes Antikörper in einem Komplex-Antiserum vorhanden sind, ohne daß man die jeweiligen Untereinheiten des Proteinkomplexes isoliert haben muß.

Die Kreuzimmunelektrophorese ist eine zweidimensionale Elektrophorese, bei der in der ersten Dimension das Antigen oder eine das Antigen enthaltende Fraktion durch SDS-Gelelektrophorese in Untereinheiten aufgetrennt wird. In der zweiten Dimension werden die Untereinheiten dann elektrophoretisch aus dem SDS-PAGE-Gel in ein Antiserum-haltiges Agarose-Gel hineingezogen, wo die mit den jeweiligen Untereinheiten reagierenden Antikörper - prinzipiell wie bei der Rocket-Immunelektrophorese - rocketförmige Präzipitationslinien bilden.

Bei der Immunoblotting-Methode werden die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Untereinheiten der Proteinkomplexe elektrophoretisch auf einen auf das SDS-Gel aufgelegten Nitrocellulose-Filter mit hoher Affinität zu Proteinen transferiert. Der Nitrocellulose-Filter stellt dann eine genaue Replik des SDS-Gels dar. Nach Absättigung der freien Bindungsstellen mit RSA inkubiert man nun den Filter mit dem zu untersuchenden Antiserum. Die im Serum enthaltenen Antikörper, die ihre Determinanten erkennen, können nun mit den auf dem Filter gebundenen Untereinheiten reagieren. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch mehrere Waschschrirte wird dem Inkubationsmedium radioaktiv markiertes Protein A zugesetzt. Protein A ist ein Zellwandprotein aus *Staphylococcus aureus* und besitzt eine hohe Affinität zu IgG. Durch diesen Schritt wird also ein radioaktives Isotop an die Stellen auf dem Nitrocellulose-Filter eingeführt, wo Antikörper der IgG-Klasse mit auf dem Filter absorbierten Proteinen bzw. Untereinheiten eines Proteinkomplexes reagiert haben. Durch Autoradiographie können diese Stellen dann sichtbar gemacht werden.

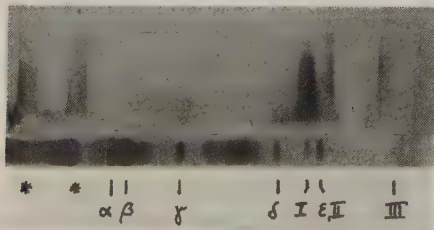


Abb. 18: Kreuz-Immunelektrophorese nach CHUA & BLOMBERG (30).
Antikörper-Gel: 400 µl AS 169-4 A. SDS-Gelstreifen: Immunpräzipitierter CF₁-CF₀ aus in Triton X-100 solubilisierten Kontroll-Chloroplasten.
SDS-PAGE: 13,5 % Acrylamid-Gel

* : unvollständig dissoziierte Antigen-Antikörper-Aggregate

Wie Abb. 18 zeigt, konnten durch Kreuz-Immunelektrophorese im AS 169-4 A Antikörper gegen CF_0 -Untereinheit I und III nachgewiesen werden. Die in der ϵ -Position auftretende und nicht völlig geschlossene Präzipitationslinie wurde durch Antikörper gegen die im Gelsystem ohne Harnstoff mit ϵ komigrierende CF_0 -Untereinheit II verursacht. Dies belegt die weitaus empfindlichere Immunoblotting-Analyse eindeutig (Abb. 19 B), bei der das besser auflösende Harnstoff-Gelsystem eingesetzt werden konnte. Während mit CF_1 in der ϵ -Region keine Reaktion auftrat (Abb. 19 B, Tasche 3), konnte Reaktion mit allen drei CF_0 -Untereinheiten beobachtet werden (Abb. 19 B, Tasche 1, 2 und 4). Der große schwarze Fleck

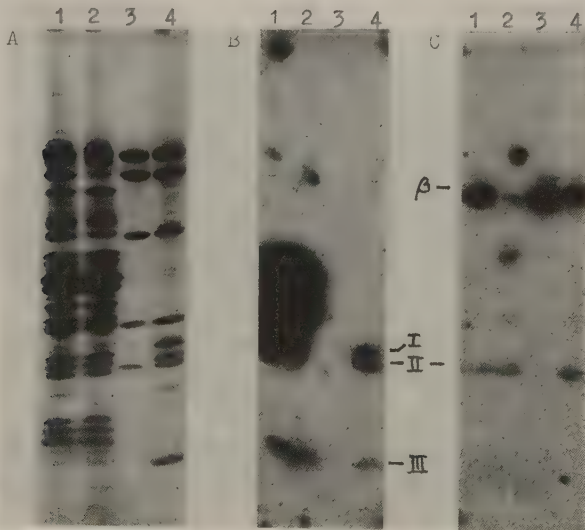


Abb. 19: Immunoblotting-Analyse der CF_0 -Antiseren 169-4A und 187-A
Abb. 19 A: SDS-PAGE-Referenzgel. 13-18% Acrylamid-Gradient, 2,5 M Harnstoff. 1: Kontroll-Chloroplasten (3 μ g Chl) 2: EDTA-beh. Chloroplasten (3 μ g Chl) 3: CF_1 (7,5 μ g) 4: CF_1 - CF_0 (15 μ g).
Abb. 19 B: Immunoblotting: 16 μ l AS 169-3 A. 1: Kontroll-Chloroplasten (1,8 μ g Chl) 2: EDTA-behandelte Chloroplasten (1,8 μ g Chl) 3: CF_1 (1,5 μ g) 4: CF_1 - CF_0 (1,9 μ g).
Abb. 19 C: Immunoblotting 24 μ l AS 187-A. 1-4: wie in Abb. 19 B.
Elektrophoretischer Transfer auf Nitrocellulose: Standardbedingungen (Kap. VIII. 13.4.)

ist ein Versuchsartefakt und wurde vermutlich durch eine radioaktive Kontamination der Filmkassette hervorgerufen. Aus zeitlichen Gründen konnten die zu einem sehr späten Zeitpunkt bei Prof. Hermann (Universität Düsseldorf) durchgeführten Immunoblotting-Analysen nur zweimal durchgeführt werden. Bei dem zweiten, hier nicht gezeigten Experiment trat mit Kontroll-Chloroplasten in der LHCP-Region ebenfalls eine Reaktion auf, die auf dem in Abb. 19 gezeigten Blot-Streifen wegen des Artefakts nicht zu erkennen ist.

In dem mit CF_1 absorbierten Antiserum gegen immunpräzipitierten CF_1 - CF_0 (AS 187-4) konnten mit der Immunoblotting-Methode nur Antikörper gegen CF_0 -Untereinheit II und durch Absorption mit isoliertem CF_1 offenbar nicht zu entfernende Antikörper gegen die β -Untereinheit des CF_1 nachgewiesen werden (Abb. 19 C).

3.4. Herstellung und Charakterisierung von Antiseren gegen die Proteolipid-Untereinheit des CF_0

Mit dem durch Extraktion von Chloroplasten mit Chloroform/Methanol 2:1 (2.1.) isolierten und in SDS-haltigem Puffer gelösten Proteolipid-Präparat wurden zwei Kaninchen (Nr. 171 und 172) immunisiert (siehe Methodenteil). Für Primär- und Booster-Injektionen wurden jeweils etwa 1 mg Protein pro Kaninchen eingesetzt. Dem Kaninchen 171 war vor der Immunisierung mit Proteolipid bereits - scheinbar erfolglos - isolierte ϵ -Untereinheit des CF_1 injiziert worden.



Abb. 20: Spezifitätsanalyse der Proteolipid-Antiseren durch Ouchterlony-Test.
a: AS 171-4 (anti-III)
b: AS 172-3 (anti-III)
c: Proteolipid (0,5 mg/ml in 0,3 % SDS)
d: Proteolipid (0,5 mg/ml in 0,3 % SDS, 2 % Triton X-100)
e: Kontroll-Chloroplasten (0,7 mg Chl/ml in 3 % Triton X-100) f: AS 170-2 (anti- CF_0)
g: 0,3 % SDS, 2 % Triton X-100 h: 0,3 % SDS. Probenvolumen: e 24 μ l, sonst 6 μ l

in 3 % Triton X-100) f: AS 170-2 (anti- CF_0)
Triton X-100 h: 0,3 % SDS. Probenvolumen: e 24 μ l, sonst 6 μ l

Die Reaktion beider Antiseren mit dem Immunogen (Abb. 20) zeigt deutlich, daß die Immunisierungen positiv verlaufen waren: Schwächere Präzipitation war zu beobachten, wenn dem in SDS gelösten Proteolipid Triton X-100 zugesetzt wurde. Da das AS 171-4 einen deutlich höheren Präzipitationstiter als 172-3 aufwies, wurde es für die weiteren Untersuchungen verwendet. Da auch der Titer von AS 171-4 relativ schwach war, wurde in den weiteren Experimenten die aus AS 171-4 durch Ammoniumsulfat-Fällung bis 45 % Sättigung angereicherte und konzentrierte IgG-Fraktion eingesetzt. Durch Dialyse gegen 10-150-Puffer wurde das $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vollständig entfernt. Antikörper gegen CF_1 (Abb. 21) bzw. in

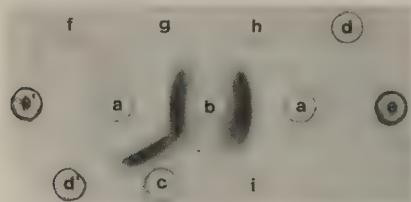


Abb. 21: Spezifitätsanalyse des Proteolipid-Antiserums 171-4.

a: AS 171-4 (anti-III)
b: Proteolipid (0,3 mg/ml in 0,15 % SDS, 3 % Triton X-100)
c: CF_1 - CF_0 -Rohpräparat (3 mg/ml in 3 % Triton X-100)
d u. d': Kontroll-Chloroplasten (1 mg/ml in 3 % Triton X-100) e u. e': wie d (1 mg/ml in 0,5 % SDS, 3 % Triton X-100)

f: CF_1 (0,5 mg/ml in 40 mM Tricin-NaOH pH 7,8 2 mM EDTA) g: AS 169-4'A (anti- CF_0) h: KS 171-0 i: 0,15 % SDS, 3 % Triton X-100
Probenvolumen: a 36 μl , c 4 μl , d' u. e' 30 μl , g u. h 18 μl , sonst 6 μl

SDS denaturierten CF_1 konnten im AS 171-4 durch Ouchterlony-Test nicht nachgewiesen werden. Während mit in Triton X-100 oder Triton X-100/SDS gelösten Kontroll-Chloroplasten keine Reaktion auftrat, bildete das AS 171-4 mit einem sehr konzentrierten CF_1 - CF_0 -Rohpräparat zwei stets diffuse Präzipitationslinien. Das in der schwächeren Linie präzipitierte Protein war immunologisch identisch mit dem isolierten Proteolipid (Abb. 21), die andere Komponente konnte nicht identifiziert werden. Die Immunoblotting-Analyse bestätigte eindeutig, daß AS 171-4 Antikörper gegen die Proteolipid-Untereinheit des CF_1 - CF_0 -Komplexes enthielt (Abb. 22). Mit der sehr empfindlichen Methode konnten auch Antikörper gegen die ϵ -Untereinheit des CF_1 nachgewiesen werden, die wohl von einer früheren, nach intensiven Spezifitätsanalysen durch Ouchterlony Tests als ergebnislos eingestuften Immunisierung des Kanin-

chens mit isolierter ϵ -Untereinheit herrührten.

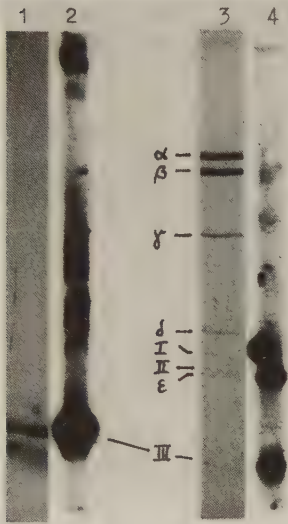


Abb. 22: Immunoblotting-Analyse des Proteolipid-Antiserums 171-4.
1: SDS-PAGE-Referenzgel zu 2 mit isoliertem Proteolipid (13 μ g Protein)
2: Immunoblotting 4 μ l AS 171-4
3: SDS-PAGE-Referenzgel zu 4 mit isoliertem CF_1 - CF_0 -Komplex (ca. 5 μ g)
4: Immunoblotting 4 μ l AS 171-4
SDS-PAGE: 13-18 % Acrylamid-Gradient, 2,5 M Harnstoff
Elektrophoretischer Transfer auf Nitrocellulose: Standardbedingungen

IV. DISKUSSION

In dieser Zwischendiskussion sollen die in den Abschnitten 1. bis 3. vorgestellten Ergebnisse zur CF_1 - CF_0 - und Proteolipid-Isolierung sowie die Herstellung und die Spezifitäten der CF_0 -Antisera diskutiert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene neue Methode zur CF_1 - CF_0 -Isolierung aus Triton X-100-Extrakten durch Anionenaustauscher-Chromatographie und Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation stellt eine für bestimmte Aufgaben - wie z.B. Untereinheiten-Präparationen - geeignete Alternative zur Cholat/Octylglucosid-Extraktionsmethode nach PICK & RACKER (86) dar. Die Reinheit des mit Hilfe des neutralen Detergenzes Triton X-100 extrahierten CF_1 - CF_0 -Komplexes reicht sicherlich an die der nach PICK & RACKER (86) isolierten Präparate heran (Abb. 6). Lediglich die vollständige Entfernung von FNR und CDM aus dem CF_1 - CF_0 -Komplex-Präparaten läßt sich durch die Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation nicht erreichen (Abb. 5). Dieses Problem tritt aber ebenso bei der Reinigung des CF_1 - CF_0 aus Cholat/Octylglucosid-Extrakt auf (86). Die Verunreinigungen an CDM können deutlich vermindert werden, wenn die als Ausgangsmaterial für die Präparation verwendeten isolierten Lamellarsysteme mehrmals durch Resuspension und Zentrifugation in einem Tris-haltigen Medium gewaschen werden (1.3.). Alkalischer Tris-Puffer löst nach AKERLUND & JANSSON (2) CDM von den isolierten Thylakoidmembranen ab. Ob die enzymatische Aktivität des CF_1 - CF_0 -Komplexes durch diese Waschprozedur beeinträchtigt wird, wurde nicht untersucht, scheint mir aber schon allein aufgrund der längeren Präparationsdauer wahrscheinlich.

Unter den gewählten Extraktionsbedingungen wird CF_1 - CF_0 fast vollständig solubilisiert, während nur geringe Mengen an Chlorophyll-haltigen Proteinen (z.B. LHCP) extrahiert werden (Abb. 4). Für den beobachteten $MgCl_2$ -Effekt auf die CF_1 /Chl-Anreicherung (Abb. 3) kann keine einleuchtende Erklärung abgegeben werden, vielleicht wird die Membranstruktur (Grana ?) durch die divalenten Kationen stabilisiert und weniger gut solubilisierbar durch Triton X-100. Aus dem Ultrazentrifugationsüberstand kann durch

Ionenaustauscher-Chromatographie neben dem CF_1 - CF_0 -Komplex auch noch ein 34 kd-Protein, das möglicherweise mit dem Wasser-Spaltungssystem des photosynthetischen Elektronentransports assoziiert ist (61), in guter Reinheit isoliert werden (10). Die Präparationsdauer für eine CF_1 - CF_0 -Standard-Präparation (60 mg Chl) beträgt bis zur Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation etwa 6-7 Stunden und ist somit nur wenig länger als bei der Cholat/Octylglucosid-Extraktion (ca. 5 Std.). Da das für die Ionenaustauscher-Chromatographie benutzte Gelmaterial nach Regeneration wiederverwendet werden kann, liegen die Kosten für eine CF_1 - CF_0 -Präparation aus Triton X-100-Extrakt erheblich unter denen, die für eine Präparation durch Cholat/Octylglucosid-Extraktion veranschlagt werden müssen.

Der in Liposomen rekonstituierte CF_1 - CF_0 -Komplex aus Triton X-100-Extrakt wies im Vergleich zu den von PICK & RACKER (86) veröffentlichten Werten nur eine sehr geringe ^{32}P -ATP-Austausch-Aktivität auf (Abb. 7). Ein nicht optimaler Aktivitäts-Test scheidet als Ursache für die geringe spezifische Austausch-Aktivität wohl aus, da mit isolierten Lamellarsystemen unter ganz ähnlichen Bedingungen relativ hohe Aktivitäten erzielt werden konnten (nicht gezeigt). Eine irreversible Schädigung des CF_1 -Teils des isolierten ATP-Synthase-Komplexes durch Triton X-100 scheint ebenfalls unwahrscheinlich, da die isolierten CF_1 - CF_0 -Präparate nach Aktivierung (37) beträchtliche Ca^{2+} -abhängige ATPase-Aktivitäten (ca. $20 \mu\text{mol} \times \text{mg } CF_1^{-1} \times \text{min}^{-1}$) aufweisen. Wahrscheinlicher erscheint eine Inaktivierung des CF_0 -Teils durch Triton X-100; möglicherweise werden durch das Detergenz bei der Solubilisierung und Reinigung für die Funktion essentielle Lipide entfernt. Auch PICK & RACKER (86) bemerken, daß der mit Cholat/Octylglucosid extrahierte und auf Triton X-100-haltigen Sucrose-Dichtegradienten gereinigte Komplex deutlich niedrigere spezifische Aktivitäten als der auf Cholat-haltigen Sucrose-Dichtegradienten gereinigte Komplex besitzt.

Eine Inaktivierung des CF_0 durch selektiven Verlust einer für die Aktivität essentiellen Untereinheit kann wohl auch ziemlich sicher als Ursache für die niedrigen spezifischen Aktivi-

täten des rekonstituierten CF_1 - CF_0 -Komplexes ausgeschlossen werden, da der aus Triton X-100-Extrakt isolierte Komplex nach hochauflösender SDS-PAGE mit 3 verschiedenen CF_0 -Untereinheiten die gleiche Untereinheitenzusammensetzung aufwies wie nach PICK & RACKER (86) gereinigter CF_1 - CF_0 (Abb. 6) mit hoher Austausch-Aktivität. Möglicherweise ist das in Abb. 6 mit einem Pfeil markierte Protein identisch mit dem von PICK & RACKER (86) als CF_0 -I (17,5 kd) bezeichneten Peptid. Es ist durch SDS-PAGE in CF_1 - CF_0 -Komplex aus Triton X-100-Extrakt bzw. aus Cholat/Octylglucosid-Extrakt (siehe auch HERMANN et al., 49) sowie in immunpräzipitiertem CF_1 - CF_0 nachweisbar (Abb. 6), kommt aber nach Abschätzung der Coomassiefärbung in deutlich substöchiometrischen Mengen vor und wird deshalb in neueren Veröffentlichungen (49, 74, 112) und auch in dieser Arbeit nicht als CF_0 -Untereinheit bezeichnet. Für die von NELSON (77) geäußerte Vermutung, daß es sich bei dem von PICK & RACKER (86) als vierte CF_0 -Untereinheit angesehenen, in SDS-Gelen ohne Harnstoff mit δ komigrierenden Protein um ein geringfügig modifiziertes δ -Peptid handeln könnte, gibt es keinerlei Evidenzen. Antikörper gegen δ reagierten in der Immunoblotting-Analyse mit dem knapp über CF_0 -I laufenden Peptid nicht (nicht gezeigt).

Die Tatsache, daß der durch Triton X-100-Extraktion isolierte CF_1 - CF_0 -Komplex die gleiche Untereinheitenzusammensetzung wie der mit Cholat/Octylglucosid extrahierte Komplex aufweist, kann auf jeden Fall als ein Indiz dafür gewertet werden, daß der CF_0 -Komplex aus mindestens drei verschiedenen Untereinheiten besteht. Es soll allerdings nicht unerwähnt bleiben, daß aus dem isolierten TF_0 -Komplex (3 TF_0 -Untereinheiten) eine sogenannte Untereinheit entfernt werden konnte, ohne daß sich die funktionellen Eigenschaften des Komplexes - soweit sie untersucht wurden - wesentlich veränderten (106). Hieraus könnte man den Schluß ziehen, daß das für die Funktion offenbar nicht notwendige Peptid eine festgebundene Kontamination des isolierten Komplexes sein könnte. Eine später noch zu diskutierende Veröffentlichung (111), die kurz vor Abschluß des experimentellen Teils dieser Arbeit erschien, scheint in der Tat Hinweise dafür zu enthalten, daß zwei der bislang als CF_0 -Untereinheiten bezeichneten Peptide

des aus Triton X-100-Extrakten immunpräzipitierten CF_1 - CF_0 -Komplexes aus *Vicia faba* festgebundene Kontaminationen des nur aus 4-6 Proteolipid-Untereinheiten bestehenden CF_0 sind.

Die in mehreren Veröffentlichungen angegebenen Molekulargewichte für die CF_0 -Untereinheiten aus Spinat differieren ganz erheblich (77, 86, 116, Kap. III.1.3. dieser Arbeit). Zumindest für CF_0 -Untereinheit II kann ein Teil der Differenzen auf das unterschiedliche Laufverhalten des Peptids in verschiedenen Gelsystemen zurückgeführt werden. Das im LUGTENBERG-Gelsystem (66) ohne Harnstoff mit ϵ komigrierende Peptid weist in demselben Gelsystem mit Harnstoff gegenüber ϵ ein scheinbar größeres Molekulargewicht auf, während es im Gelsystem nach HARMS et al. (45) unterhalb von ϵ läuft (49, 116).

Es wurde nicht versucht, die Untereinheiten-Stöchiometrie des CF_1 - CF_0 -Komplexes mit Hilfe eines Scans abzuschätzen, da der zur Verfügung stehende Gelscanner die sehr nah auf dem SDS-Gel zusammenliegenden CF_0 -Untereinheiten I und II sowie die CF_1 -Untereinheit ϵ nicht aufzulösen vermochte und darüber hinaus die Stöchiometriebestimmung durch Ermittlung der Coomassieverteilung im SDS-Gel aufgrund möglicher Unterschiede in der spezifischen Anfärbbarkeit von verschiedenen Untereinheiten sehr ungenau sein kann. Es muß aber darauf hingewiesen werden - dies ist in Abb. 4 deutlich zu erkennen - daß der zufällig ausgewählte Referenz- CF_1 gegenüber dem isolierten CF_1 - CF_0 -Komplex bei etwa gleichstarker Färbung der α - und β -Untereinheit deutlich weniger δ und ϵ enthielt. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Untersuchungen (27), die ergaben, daß bei der Isolierung von CF_1 bevorzugt die kleinen Untereinheiten δ und ϵ verloren gehen können. CF_1 -Untereinheiten-Stöchiometriebestimmungen an isoliertem CF_1 sind daher nur als Minimalstöchiometrien aufzufassen. Die Untereinheiten-Gehaltsbestimmung mittels EID, eine von ROOS (88) für die δ -Untereinheit praktizierte Methode, umgeht diese Schwierigkeiten, da der δ -Gehalt von membrangebundenem CF_1 bestimmt wird.

Verschiedene Autoren (46, 73, 77) bemerken, daß sie die Proteolipid-Untereinheit des CF_1 - CF_0 nur auf sehr stark überladenen SDS-Gelen von isoliertem CF_1 - CF_0 -Komplex identifizieren kön-

nen. Da man bei einer Stöchiometrie von 6 Proteolipiden / CF_1 (103) und bei gleicher spezifischer Färbbarkeit durch Coomassie in der Proteolipid-Bande mehr Blaufärbung finden müßte als in der γ -Region, vermutete man, daß das extrem hydrophobe Proteolipid durch Coomassie schlecht anfärbbar sei (46, 73) bzw. bei der Färbeprozedur aus den Gelen diffundiere (77). Zwar ist die spezifische Färbung von Proteolipid durch Coomassie nach Angaben von SEBALD & HOPPE (95) in der Tat 5-10 mal niedriger als die von Cytochrom C, angesichts der in dieser Arbeit präsentierten Gele (Abb. 4), die keineswegs überladen erscheinen, muß aber wohl eher vermutet werden, daß die von diesen Autoren hergestellten CF_1 - CF_0 -Präparate abgereichert an Proteolipid-Untereinheit waren.

Ein erstes Etappenziel dieser Arbeit war, wie aus der Problemstellung hervorgeht, die Herstellung von Antisera gegen den CF_0 -Komplex. Eine Immunisierung von Kaninchen mit isoliertem CF_0 war aber nicht möglich, weil die unternommenen Versuche zur Isolierung von CF_0 nicht erfolgreich waren. Um dennoch zu den für die geplanten Untersuchungen absolut notwendigen CF_0 -Antisera zu gelangen, mußte die Strategie geändert werden.

Durch Immunisierung von Kaninchen mit isoliertem bzw. immunpräzipitiertem CF_1 - CF_0 -Komplex konnten Antisera erzeugt werden, in denen neben CF_1 -Antikörpern noch Antikörper gegen ein durch EDTA-Behandlung nicht von der Thylakoidmembran zu entfernendes Protein, das stets auch in hochgereinigten CF_1 - CF_0 -Präparaten anwesend und nicht mit FNR identisch ist, nachgewiesen werden konnten. Der naheliegende Schluß, daß es sich bei diesen Antikörpern um CF_0 -Antikörper handelt, konnte durch Spezifitätsuntersuchungen mittels Kreuz-Immunelektrophorese bzw. Immunoblotting-Analyse und Präzipitationsversuche eindeutig belegt werden. Die hergestellten Antisera enthielten Antikörper gegen die dem CF_0 zugerechneten Peptide (Abb. 19). Darüber hinaus kann das von den mit CF_1 absorbierten CF_1 - CF_0 -Antisera angezeigte Protein durch CF_1 -Antikörper-Zugabe zu in Triton X-100 aufgelösten Thylakoidmembranen quantitativ auspräzipitiert werden (siehe 4.3.).

Mit der in Abschnitt 3.3.1. vorgestellten Methode zur Absorption

der in den CF_1 - CF_0 -Antisera enthaltenen CF_1 -Antikörper kann eine vollständige Entfernung der mit isoliertem CF_1 reagierenden Antikörper erreicht werden. Die Gelfiltration des Serums nach Zugabe von CF_1 im Überschuß garantiert eine vollständige Abtrennung des überschüssigen CF_1 , der nicht abzentrifugierbaren Antigen-Antikörper-Komplexe und des eingeschleppten Ammoniumsulfats von der IgG-Fraktion, die ja die gewünschten CF_0 -Antikörper enthält. In den CF_1 - CF_0 -Antisera enthaltene Antikörper gegen in einem CF_1 - CF_0 -Rohpräparat enthaltene Verunreinigungen (u.a. FNR) konnten nach dem Absorptionsschritt ebenfalls nicht mehr nachgewiesen werden, sind also offenbar durch im benutzten CF_1 -Rohpräparat vorhandene Proteine neutralisiert worden. Da die CF_1 - CF_0 -Antisera nach der Absorption mit CF_1 auch gegen Rohpräparate (CF_1 - CF_0 , Kontroll-Chloroplasten) nur jeweils eine Präzipitationslinie bildeten, sind sie als monspezifische CF_0 -Komplex-Antisera zu bezeichnen.

Besondere Aufmerksamkeit verdient das Antiserum 187-A. Da in ihm nur CF_0 -Antikörper gegen Untereinheit II nachgewiesen werden konnten (Abb. 19), kann man es - mit gewissen Einschränkungen - als ein CF_0 -Untereinheiten-Antiserum bezeichnen. Eingeschränkt werden muß diese Aussage, weil das Fehlen einer positiven Reaktion des Antiserums 187-A mit I und III nicht als Beweis für Abwesenheit von Antikörpern gegen I und III gewertet werden kann. Es läßt sich nicht mit letzter Sicherheit ausschließen, daß im AS 187-A vielleicht doch Antikörper gegen I und III enthalten sind (I und III waren ja im Immunogen anwesend), sich aber durch Kreuzimmunelektrophorese und Immunoblotting nicht nachweisen lassen, weil sie gegen die native Konformation der Untereinheiten (in Triton X-100) im CF_0 gerichtet sind und möglicherweise mit den dissoziierten Untereinheiten I und III absolut nicht reagieren. Dieser Fall könnte nur dann eintreten, wenn alle oder der überwiegende Teil der Determinanten von I und III, gegen die Antikörper im Serum vorhanden sind, sich durch SDS-Behandlung so verändern, daß sie nicht mehr von den Antikörpern erkannt werden können. Dies muß aber wohl als sehr unwahrscheinlich eingeschätzt werden, zumal mit derselben Methode im AS 169-3 A Antikörper gegen I und III nachgewiesen

werden konnten. Die Konformationen von I und III im nativen Komplex können also nicht gänzlich verschieden von denen der dissoziierten Untereinheiten sein.

Die im AS 187-A enthaltenen und nur durch Immunoblotting nachweisbaren Antikörper gegen die β -Untereinheit des CF_1 sind durch Absorption mit isoliertem CF_1 nicht zu entfernen. Daraus folgt, daß die Determinanten von β , gegen die diese Antikörper gerichtet sind, in isoliertem CF_1 nicht exponiert sind. Möglicherweise steht das Vorkommen dieser β -Antikörper damit in Zusammenhang, daß mit Hilfe von CF_1 -Antikörpern immunpräzipitierter CF_1 - CF_0 -Komplex für die Immunisierung des Kaninchens verwendet wurde. Es erscheint durchaus denkbar, daß durch die Reaktion der CF_1 -Antikörper mit dem CF_1 -Teil des in Triton X-100 solubilisierten CF_1 - CF_0 -Komplexes - sozusagen durch "Verbiegen von Untereinheiten" - normalerweise nicht exponierte Teile der β -Untereinheit an die Oberfläche des CF_1 geraten. Die von den mit diesen Immunpräzipitaten immunisierten Kaninchen produzierten Antikörper gegen solche "zusätzlichen" Determinanten könnten weder mit isoliertem CF_1 absorbiert noch durch Uchterlony-Tests nachgewiesen werden, da die entsprechenden Determinanten auf isoliertem CF_1 ja nicht zugänglich sind. Erst nach Dissoziation des CF_1 können diese Antikörper mit ihren Determinanten reagieren und z.B. durch Immunoblotting nachgewiesen werden.

Die in Kap. III.2. beschriebenen Methoden zur Isolierung der Untereinheit III des CF_0 -Komplexes nutzen die Löslichkeitseigenschaften des Proteins aus. Es ist das einzige Peptid des isolierten CF_1 - CF_0 -Komplexes, wenn nicht sogar der Thylakoidmembran, das in Chloroform/Methanol 2:1 löslich ist. Die SDS-PAGE des isolierten, nach dem Eindampfen des Lösungsmittels nur in SDS löslichen Proteins zeigt deutlich, daß das Proteolipid nach C/M-Extraktion die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit besaß, wie die entsprechende Untereinheit im isolierten CF_1 - CF_0 -Komplex (Abb. 8 u. 9). Ob es sich bei dem an der Gelfront festzustellenden, durch Coomassie angefärbten Material um ein anderes C/M 2:1-lösliches Protein oder um Bruchstücke des Proteolipids bzw. anderen Proteine handelt, konnte nicht geklärt werden.

Unter der Annahme, daß pro mg Chl etwa 0,5 mg CF_1 (Molekulargewicht 325000, 36) in Thylakoidmembranen enthalten ist (88), läßt sich aus der Ausbeute von 64 μ g Proteolipid pro mg Chl schließen, daß mindestens 5 Mol Proteolipid pro Mol CF_1 in der Thylakoidmembran vorhanden sein müssen. Da aber weder die Reinheit der isolierten Proteolipid-Fraktion noch die prozentuale Ausbeute bei der Extraktion zuverlässig abgeschätzt werden kann, muß dieser Wert mit Vorsicht betrachtet werden. Zusätzlich kann bei der Proteinbestimmung des Proteolipids nach LOWRY et al. (65) mit RSA als Standard ein möglicherweise erheblicher Fehler auftreten, wie SEBALD & HOPPE (95) aufgrund der Aminosäureanalysen von Proteolipiden aus verschiedenen Organismen ermitteln konnten. Da der Korrekturfaktor für Chloroplasten-Proteolipid nicht angegeben wird, kann der oben angegebene Wert leider nicht korrigiert werden. Die von SIGRIST-NELSON et al. (103) vorgeschlagene Stöchiometrie von 6 Proteolipiden pro CF_1 kann daher weder zuverlässig unterstützt noch ausgeschlossen werden.

Das durch Immunisierung mit Proteolipid gewonnene Antiserum 171-4 enthält, wie Ouchterlony-Tests (Abb. 20 u. 21) und Immunoblotting-Analyse (Abb. 22) ergaben, Antikörper, die mit dem isolierten Peptid reagieren. Reaktion trat auch mit einem sehr konzentrierten CF_1 - CF_0 -Rohpräparat (in Triton X-100) auf. Im Gegensatz dazu konnte mit in Triton X-100 gelösten Thylakoidmembranen keine Reaktion beobachtet werden. Der Befund, daß Zugabe von Triton X-100 zu dem in SDS gelösten Proteolipid eine deutliche Abschwächung der mit AS 171-4 erhaltenen Präzipitationslinie bewirkte (Abb. 20), mag als ein Hinweis darauf gedeutet werden können, daß die in dem Serum enthaltenen Proteolipid-Antikörper mit der in Triton X-100 vorliegenden Konformation des Proteolipids weniger gut reagieren als mit der SDS-Konformation. Die offenbar nicht oder schlecht präzipitierenden ϵ -Antikörper im AS 171-4 müssen ebenso wie die β -Antikörper im Antiserum 187-A bei der Konzeption von Inhibitions-Experimenten berücksichtigt werden.

V. ERGEBNISSE

4. Quantitative Bestimmung von CF_0 durch Elektroimmunodiffusion

Als eine für die quantitative Bestimmung von CF_0 in detergensen-solubilisierten Thylakoidmembranen und detergensenextrahiertem CF_1 - CF_0 -Komplex geeignete Methode erwies sich die ursprünglich nur zur Quantifizierung von wasserlöslichen Proteinen angewendete (62), von P. ROOS & BERZBORN (25, 89) auch auf ein membran-gebundenes Protein wie CF_1 übertragene Methode der Elektroimmuno-diffusion oder Rocketimmunoelektrophorese. Das Prinzip der Rocket-immunoelektrophorese beruht darauf, daß durch Elektrophorese das zu bestimmende Protein in ein mit spezifischen Antikörpern be-ladenes Agarosegel hineingezogen wird. Das Antigen wandert so-lange, bis stabile, auspräzipitierende Antigen-Antikörper-Kom-plexe gebildet werden. Die Länge der wegen ihrer Form "rockets" genannten Präzipitationslinien ist direkt proportional zur An-tigenmenge und umgekehrt proportional zu den in das Agarosegel eingegossenen Antiserummengen.

4.1. Rocketbildung mit detergensen-solubilisierten Thylakoidmem-branen

Die für die CF_0 -Mengenbestimmungen verwendeten CF_0 -Antiseren 169-4 A und 187-A ergaben mit in 3 % Triton X-100 gelösten Thy-lakoidmembranen nur jeweils eine Rocket (Abb. 23), deren Form sich von CF_1 -Rockets kaum unterschied. Die Proportionalität von Rocketlänge und Antigenmenge ist in Abb. 24 gezeigt. Die von ROOS (88) in unserem Labor optimierten Bedingungen für die Solu-



Abb. 23: Beispiel für CF_0 -Rockets
Proben: Je 6 μ l in 3 % Triton
X-100 gelöster Kontroll-Chloro-
plasten. Von oben nach unten:
2,4, 1,8, 1,2 und 0,6 μ g Chl.
AS: 100 μ l 169-3 A/10 ml Gel

bilisierung von Membranen in dem relativ milden, die Quartärstruktur von Protein-Komplexen in den meisten Fällen nicht zerstörenden (48) Detergenz Triton X-100 sowie die für die Rocketbestimmung von membrangebundenem CF_1 erarbeiteten Elektrophoresebedingungen (Spannung, Dauer, Temperatur, Probenvolumen) erbrachten auch bei der CF_0 -Rocket-Bestimmung optimale Resultate. Zugaben von Triton X-100 zum Agarosegel erwiesen sich als nicht notwendig.

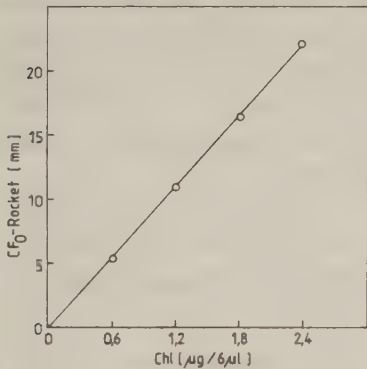


Abb. 24: Abhängigkeit der CF_0 -Rocketlänge von der Antigenmenge Proben: Je 6 µl in 3 % Triton X-100 gelöster Kontroll-Chloroplasten.

EID: 100 µl AS 169-3 A/10 ml Gel

Die auf CF_0 -Gehalt zu analysierenden Proben wurden in den einzelnen Experimenten unter jeweils konstant gehaltenen Bedingungen (Salz, pH, Puffersubstanz, Saccharose, Detergenzkonzentration) getestet, um eventuell störende, durch unterschiedliche Konzentrationen der angesprochenen Substanzen hervorgerufene Einflüsse von vornherein auszuschließen. $MgCl_2$ bis 10 mM beeinflusste die CF_0 -Rocketlänge nicht. AS 187-A eignete sich ebenso wie AS 169-3 A für Rocketanalysen. Um mit identischen Proben gleich lange Rockets zu erzielen, mußte etwa 50 % mehr AS 187-A als 169-3A eingesetzt werden.

4.2. Rocketbildung mit detergenzextrahiertem CF_1 - CF_0 -Komplex

Wie Abb. 25 zeigt, konnten auch mit detergenzextrahiertem CF_1 - CF_0 -Komplex CF_0 -Rockets erhalten werden. Obwohl die Triton X-100-Konzentration bei der Bestimmung von CF_0 in CF_1 - CF_0 -Präparaten



Abb. 25: CF_0 -Rockets mit Cholat/Octylglucosid-extrahiertem CF_1 - CF_0 -Komplex nach Reinigung durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation. Von oben nach unten: 1:4, 1:6, 1:8 und 1:16 verdünnte Fraktion in 3 % Triton X-100. EID: 100 μ l AS 169-3 A/10 ml Gel

keinen Einfluß auf die CF_0 -Rocketlänge hatte, wurden auch diese Proben jeweils auf 3 % Triton X-100 gebracht, um absolut identische Bedingungen bei CF_0 -Bestimmungen in Thylakoidmembranen und CF_1 - CF_0 -Präparaten zu gewährleisten. Wie aus Abb. 25 leicht abgeleitet werden kann (siehe auch Abb. 28), gilt auch für detergentextrahierten CF_1 - CF_0 -Komplex die proportionale Abhängigkeit der Rocketlänge von der Antigenmenge.

4.3. Vergleichbarkeit von CF_0 - und CF_1 - CF_0 -Rockets; Immunpräzipitation von CF_1 - CF_0 -Komplex aus in Triton X-100 solubilisierten Membranen

Die direkte Vergleichbarkeit der CF_0 -Rocketlängen aus in Triton X-100 solubilisierten Kontroll-Chloroplasten und detergentextrahiertem CF_1 - CF_0 -Komplex (immunologische Identität von CF_0 aus Thylakoidmembranen und isoliertem CF_1 - CF_0 ist z.B. in Abb. 16 gezeigt) mit EDTA-behandelten Chloroplasten setzt voraus, daß CF_1 - CF_0 -Komplex und CF_0 gegenüber dem für die EID verwendeten CF_0 -Antiserum immunologisch identisch sind. Im Ouchterlony-Test gefundene Identitätslinien von CF_0 aus solubilisierten Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten können dies aber nicht beweisen, da CF_1 - CF_0 unter den beim Ouchterlony-Test herrschenden Bedingungen vollständig dissoziiert (separate CF_1 - und CF_0 -Präzipitationslinien, Abb. 11), also in jedem Falle nur CF_0 und kein CF_1 - CF_0 -Komplex mit den CF_0 -Antikörpern reagiert. Eine mögliche partielle Identität von CF_1 - CF_0 und CF_0 gegenüber dem CF_0 -Antiserum kann somit gar nicht demonstriert werden. Eine direkte Vergleichbarkeit von CF_0 -Rockets aus Kontroll- und EDTA-behandelten Chloroplasten wäre unter Umständen dann nicht mehr gegeben, wenn das Antiserum Antikörper gegen die im CF_1 - CF_0

vom CF_1 verdeckte Bindungsfläche enthielte und der CF_1 - CF_0 -Komplex bei der Rocketimmunelektrophorese nicht oder nicht vollständig dissoziierte. Der nicht an CF_1 gebundene CF_0 (EDTA-behandelte Membranen) könnte aufgrund zusätzlich exponierter Determinanten vielleicht mehr Antikörper binden und deshalb bereits nach kürzerer Laufstrecke in der Elektrophorese die zur Präzipitation notwendige Aggregatgröße erreichen als ein CF_1 - CF_0 -Komplex. CF_0 -Rockets mit EDTA-behandelten Membranen könnten unter den genannten Voraussetzungen also zu kurz ausfallen.

Das in Abb. 26 dargestellte Summenkonstanzexperiment lieferte aber einen guten Beweis für die Vergleichbarkeit von CF_1 - CF_0 und CF_0 -Rockets. Kontroll-Chloroplasten, in denen CF_0 zu 100% als CF_1 -

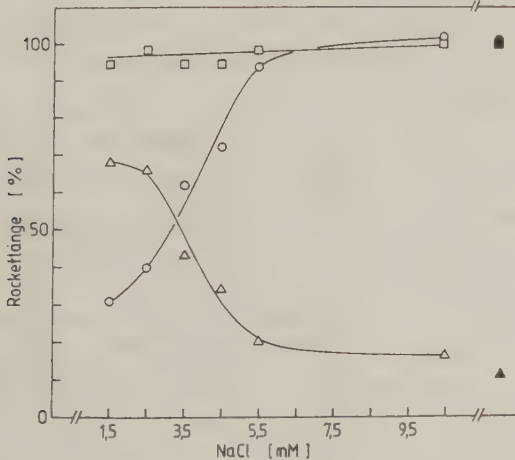


Abb. 26: Abhängigkeit des CF_1 - bzw. CF_0 -Gehaltes der Membranfraktion von der NaCl-Konzentration bei der EDTA-Behandlung (Kap. VIII.5.) Zusätzlich ist angegeben, welcher Prozentsatz an CF_0 in den verschiedenen Ansätzen durch Zugabe von CF_1 -Antiserum zu den in Triton X-100 aufgelösten Membranen nicht auspräzipitiert werden konnte (Überstandsanalyse). Die Präzipitation wurde mit AS 152-4 (anti- CF_1) unter Bedingungen durchgeführt, wo in allen Ansätzen CF_1 quantitativ auspräzipitiert wurde.

CF_1 - und CF_0 -Bestimmung durch EID: 20 μ l 150-4 (anti- CF_1) bzw. 120 μ l 169-4 A (anti- CF_0)/10 ml Gel. Als 100 %-Werte wurde jeweils die CF_1 - (31,3 mm/3 μ g Chl) bzw. CF_0 -Rocketlängen (35 mm/3 μ g Chl) von unbehandelten Kontroll-Chloroplasten (geschlossene Symbole) gewählt.

○, ● : CF_1 ; □, ■ : CF_0 ; △, ▲ : nicht durch CF_1 -Antikörper auspräzipitierbarer CF_0 .

CF_0 -Komplex vorlag, ergaben praktisch die gleiche CF_0 -Rocketlänge wie Membranen, in denen CF_0 nur zu 30% als CF_1 - CF_0 vorlag. Die mit AS 169-3 (4) A ermittelten CF_0 -Rocketlängen aus Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten sind somit direkt vergleichbar. In

den EDTA-Überständen konnte auch nach 20-facher Konzentrierung ($\hat{=}$ 2 mg Chl/ml) nie CF_0 nachgewiesen werden.

Abb. 26 zeigt auch, daß der Prozentsatz an CF_0 , der durch Zugabe von CF_1 -Antiserum zu den in Triton X-100 aufgelösten Membranen auspräzipitiert werden konnte, weitgehend mit dem CF_1 -Restgehalt der Membranen übereinstimmte. Die nicht ganz vollständige Präzipitation des CF_0 in den Kontroll-Chloroplasten führe ich auf die relativ lange Versuchsdauer bei diesem doch recht umfangreichen Experiment zurück. In separaten Versuchen, wo die AS-Zugabe bereits wenige Minuten nach dem Auflösen der Membran erfolgte, konnte stets eine fast 100 %ige Präzipitation des CF_0 beobachtet werden. Die Bestimmung des nichtpräzipitierten Anteils an CF_0 in dem in Abb. 26 dargestellten Präzipitationsexperiment stellt bereits eine erste Anwendung der ausgearbeiteten quantitativen immunologischen Methode dar und bestätigt noch einmal, daß das von AS 169-3 A und AS 187-A angezeigte Protein das Bindeprotein des CF_1 , nämlich der CF_0 ist.

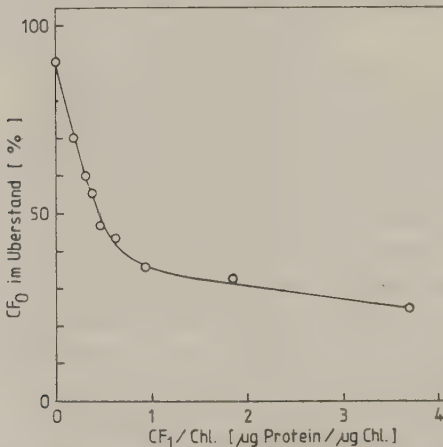


Abb. 27: Rückbindung von CF_1 an CF_0 aus in Triton X-100 solubilisierten EDTA-behandelten Membranen. Zu vorbereiteten Ansätzen (270 µl Volumen), die 22,2 mM Tricin-NaOH pH 8, 5,6 mM $MgCl_2$, 2,8 % Triton X-100 und 14,5-287,5 µg Chl (2x EDTA-behandelte Membranen) enthielten, wurden je 30 µl konzentrierter EDTA-Überstand (3mg Protein/ml, nach CF_1 -Rocketanalyse ca. 1,8 mg CF_1 /ml) bzw. 30 µl 0,75 mM EDTA zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden aus jedem Ansatz 2 x 120 µl entnommen und a) mit 40 µl 152-4 (anti- CF_1) bzw. b) mit 40 µl KS versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 4 °C wurden

die Ansätze abzentrifugiert und die CF_0 -Konzentrationen der Überstände durch EID bestimmt. Durch Vergleich der CF_0 -Rocketlänge von a) und b) wurde der nichtpräzipitierte Anteil an CF_0 ermittelt. EID: 120 µl bzw. für die Ansätze mit niedriger Chl-Konzentration 30 µl AS 170-2 A (anti- CF_0) / 10 ml Gel.

In Gegenwart ausreichender Konzentrationen ein- oder mehrwertiger Kationen (18,88) bindet CF_1 wieder an durch EDTA-Behandlung CF_1 -

veramte Membranen zurück. CF_1 -Bindungsstudien zeigten, daß nur genausoviel CF_1 rückgebunden werden kann, wie ursprünglich auf den Membranen vorhanden war (88); die Rückbindung des CF_1 erfolgt also nur spezifisch an den in den Membranen verbliebenen CF_0 . Erstaunlicherweise kann CF_1 auch an den in detergentenzsolubilisierten EDTA-behandelten Membranen enthaltenen CF_0 zurückbinden (Abb. 27), denn nach CF_1 -Zugabe zu EDTA-behandelten Chloroplasten in 2,5 % Triton X-100 konnte der CF_0 wieder durch CF_1 -Antikörper auspräzipitiert werden. Für die Rückbindung war $MgCl_2$ erforderlich, eine $MgCl_2$ -Konzentration von 1 mM gerade sättigend. Eine vollständige Besetzung aller CF_0 -Bindestellen mit CF_1 konnte allerdings auch bei hohem CF_1 -Überschuß (ca. 7 x) nicht erreicht werden.

4.4. Bestimmung von CF_0/CF_1 -Verhältnissen in Thylakoidmembranen und in CF_1 - CF_0 -Präparaten

Die Beobachtung, daß der in Triton X-100 gelöste CF_1 - CF_0 -Komplex unter bestimmten Bedingungen zumindest zu einem geringen Anteil dissoziiert vorliegen kann (Abb. 26) warf die Frage auf, ob sich während der Extraktion und Reinigung von CF_1 - CF_0 -Komplex nach PICK & RACKER (86) oder der in dieser Arbeit beschriebenen Methode (1.3.) das CF_0/CF_1 -Verhältnis in den CF_1 - CF_0 -Präparaten verändert, weil vielleicht einer der beiden Teile des dissoziierten Komplexes bei einem Reinigungsschritt abgetrennt wird. Durch parallele quantitative Bestimmung von CF_1 und CF_0 in den verschiedenen Fraktionen einer Aufarbeitung konnte diese Frage beantwortet werden. Abb. 28 zeigt, daß das CF_0/CF_1 -Verhältnis in einem CF_1 - CF_0 -Präparat aus Triton X-100-Extrakt geringfügig (ca. 12 %) und in einem CF_1 - CF_0 -Präparat aus Cholat/Octylglucosid-Extrakt deutlich (ca. 32 %) geringer war, als in Kontroll-Chloroplasten, deren CF_1/CF_0 -Verhältnis als Bezugswert diente. Der bei den beiden zufällig ausgewählten CF_1 - CF_0 -Präparaten gefundene Unterschied kann allerdings nicht als charakteristisch bezeichnet werden, da auch bei verschiedenen Triton X-100-Präparaten, insbesondere bei großen Präparationen, deutlich verschlechterte CF_0/CF_1 -Verhältnisse auftraten.

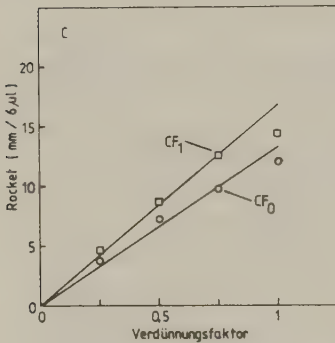
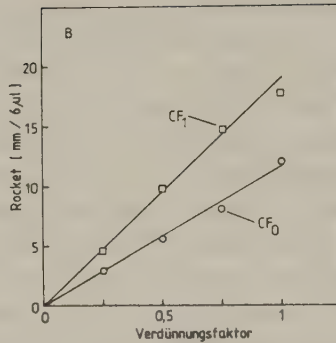
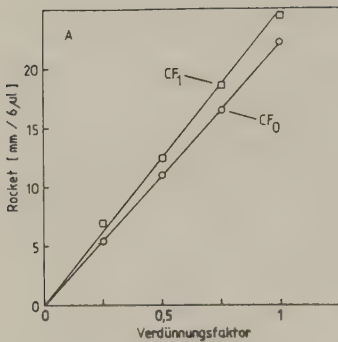


Abb. 28 A,B,C: Bestimmung des relativen CF_0/CF_1 -Verhältnisses in Kontroll-Chloroplasten und CF_1 - CF_0 -Präparaten.
A: Kontroll-Chloroplasten in 3 % Triton X-100 (ma. 0,4 mg Chl/ml).
C: CF_1 - CF_0 aus Triton X-100-Extrakt, Fr. 11 eines Sucrose-Dichte-Gr. (Verdünnung = 8x) in 3 % Triton X-100.
B: CF_1 - CF_0 aus Cholatl/Octylgl.-Extrakt, Fr. 7 eines Sucrose-Dichte-Gr. (Verdünnung = 4x) in 3 % Triton X-100.
Mit jeweils 4 Verdünnungen der angegebenen Präparate wurde unter identischen Bedingungen eine CF_0 - und CF_1 -Bestimmung durch EID durchgeführt. EID: 30 µl 150-4 (anti- CF_1) bzw. 100 µl 169-3 A (anti- CF_0) / 10 ml Gel.

Abb. 29 zeigt, daß sogar in den verschiedenen Fraktionen eines Sucrose-Dichtegradienten mit CF_1 - CF_0 aus Triton X-100-Extrakt sehr unterschiedliche CF_0/CF_1 -Verhältnisse festgestellt werden konnten. Die unteren der CF_1 -haltigen Fraktionen des Sucrose-Dichtegradienten wiesen ein deutlich höheres CF_0/CF_1 -Verhältnis auf als die oberen. Ein CF_1 , der seinen CF_0 -Teil bei der Präparation verloren hat, sedimentiert also weniger weit in den Sucrose-Dichtegradienten hinein als ein CF_1 - CF_0 -Komplex. Da Thylakoidmembranen nicht parallel mituntersucht wurden, kann die Frage, ob die Fraktionen mit maximalem CF_0 - CF_1 -Verhältnis nur CF_1 - CF_0 -Komplex enthielten, nicht beantwortet werden. In den oberen, CF_1 -freien Fraktionen des Sucrose-Dichtegradienten ließ sich durch EID isolierte δ -Untereinheit des CF_1 nachweisen. Da freies δ in Triton X-100-

haltigen Gradienten nicht gefunden werden konnte, muß das in dem in Abb. 29 analysierten Gradienten enthaltene NaCholat für die Dissoziation von δ aus dem CF_1 oder CF_1 - CF_0 -Komplex verantwortlich sein. Ein ähnlicher, allerdings durch Desoxycholat verursachter Effekt, wurde auch von ROOS (88) beobachtet. Für eine δ -Präparation eignen sich die entsprechenden Fraktionen des Sucrose-Gradienten nicht sonderlich, da weder die aus SDS-Gelen abgeschätzte Reinheit noch die Ausbeute befriedigen können. Das δ / CF_1 -Verhältnis - dies kann aus Abb. 29 abgeleitet werden - war in den Fraktionen 7-12 konstant. CF_1 und CF_1 - CF_0 waren in dem untersuchten Sucrose-Gradienten also gleich stark angereichert an δ .

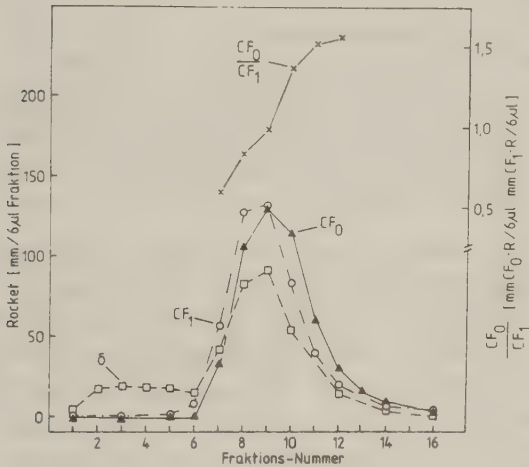


Abb. 29: CF_1 -, CF_0 - und δ -Gehaltsbestimmungen der Fraktionen eines Sucrose-Dichtegradienten (7-40 % Sucrose, 0,4 % NaCholat) mit CF_1 - CF_0 -Komplex aus Triton X-100-Extrakt (Kap.1.3.) Für die EID-Analysen wurden die einzelnen Fraktionen in geeigneter Weise verdünnt und alle Fraktionen auf 3 % Triton X-100 bzw. für die δ -Bestimmung auf 3 % Triton X-100, 0,8 % DOC eingestellt. EID: 50 μ l 152-4 (anti- CF_1) bzw. 180 μ l 170-2A (anti- CF_0) bzw. 200 μ l 168-3 (anti- δ) pro 10 ml Gel.

Durch Bestimmung der CF_0/CF_1 -Rocketlängen-Verhältnisse in den verschiedenen Fraktionen einer CF_1 - CF_0 -Präparation konnte die Frage geklärt werden, bei welchem Reinigungsschritt der in Kap. III.1.3. beschriebenen Methode CF_0 verlorengeht. Die in Tab. III zusammengestellten Ergebnisse belegen eindeutig, daß der CF_0 -Verlust nicht bei dem mit über 80 % Ausbeute sehr erfolgreichen Extraktionsschritt, sondern bei der Ionenaustauscher-Chromatographie auftritt. Mehr als 40 % des im Eluat der DEAE-Säule enthaltenen CF_1 hatte bei der untersuchten Präparation keinen CF_0 mehr gebunden. Nur etwa die Hälfte des auf die Säule aufgetragenen CF_1 und nur ca. 30 % des CF_0 wurden im Eluat der Säule wiedergefunden.

Fraktion	CF_0	CF_1	$\frac{CF_0}{CF_1}$	Ausbeute (%)	
	(mm R./6 μ l)			CF_0	CF_1
Chloroplasten (0,31 mg Chl/ml)	29,1	22,3	1,30	100	100
Ultrazentrifugations- sediment ($\hat{=}$ 0,31 mg Chl/ml)	4,7	2,9	1,62	16	13
Ultrazentrifugations- überstand ($\hat{=}$ 0,31 mg Chl/ml)	24,4	17,9	1,36	84	80
Eluat der DEAE- Sephrose CL-6B- Säule ($\hat{=}$ 0,31 mg Chl/ml)	6,9	9,5	0,73	24	43

Tab. III: Bestimmung des CF_0/CF_1 -Verhältnisses und der Ausbeuten in der verschiedenen Fraktionen einer CF_1 - CF_0 -Präparation aus Triton X-100-Extrakt (Kap. III.1.3.). Die Protein- und Chl-Bilanz dieser Aufarbeitung ist in Tab. II dargestellt. CF_1 - und CF_0 -Bestimmung durch EID. Die Fraktionen wurden in 3 % Triton X-100 gelöst (Chloroplasten u. Ultrazentrifugationssediment) bzw. auf 3 % Triton X-100 gebracht. EID: 20 μ l 150-4 (anti- CF_1) bzw. 100 μ l 170-2 A (anti- CF_0) pro 10 ml Gel.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die schlechte Ausbeute bei der analysierten Präparation darauf beruhte, daß ein Teil des in dem aufgetragenen Extrakt (800 ml $\hat{=}$ 265 mg Chl Ausgangsmaterial) enthaltenen CF_1 - CF_0 wegen nicht ausreichender Kapazität der Säule (60 ml Gel) gar nicht erst an den Austauscher binden konnte. In der später noch weiter optimierten Präparation (Kap. III.1.3.) wurde deshalb die Extrakt-Menge/ml Gel deutlich vermindert.

4.5. Verteilung von CF_1 und CF_0 innerhalb des Thylakoidmembransystems

In isolierten Chloroplasten kann man bereits lichtmikroskopisch gestapelte und nichtgestapelte Thylakoidmembranbereiche unterscheiden. Die nicht gestapelten Bereiche, Stromalamellen genannt, können durch mechanische Methoden oder Detergenz-Behandlung von den gestapelten Bereichen (Grana) abgespalten und durch differentielle Zentrifugation in angereicherter Form isoliert werden.

Durch Phasenverteilung in einem wässrigen 2-Phasensystem (5) ist es möglich, die in den Grana eng aneinanderliegenden Membranbereiche (partition) nach Yeda-press-Behandlung als inside-out-Vesikel zu isolieren. Durch Kombination von differentieller Zentrifugation und Phasenverteilung können also Membranfraktionen gewonnen werden, die aus gestapelten (nicht exponierten, 24) bzw. nichtgestapelten (exponierten) Membranbereichen des Chloroplasten herrühren. Vergleiche dieser verschiedenen Fraktionen ergaben, daß sie sich in ihren Proteinmustern und photochemischen Aktivitäten drastisch unterscheiden. Während PS I (7, 9) fast ausschließlich in den Stromalamellen lokalisiert ist, liegen PS II (7, 9) und der LHCP-Komplex (7) in den gestapelten Bereichen des Thylakoidsystems stark angereichert vor. Die extrem heterogene Verteilung der beiden im photosynthetischen Elektronentransport kooperierenden Photosysteme macht einen lateralen Elektronentransport von den PS II in den Grana zu den PS I in den Stromalamellen notwendig (4). Als mobiler Elektronenüberträger wird Plastochinon favorisiert (4).

Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (FNR), das Enzym, welches den terminalen Schritt im photosynthetischen Elektronentransport katalysiert, ist ausschließlich auf den exponierten Stromalamellen und Grana-Endmembranen vorhanden (19, 43, 56). Die Abwesenheit des auf der dem Stroma zugewandten Seite der Thylakoidmembran lokalisierten CF_1 in den nicht exponierten Bereichen der Grana wurde bereits 1969 von BERZBORN (19) vorgeschlagen, u.a. durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (70) und neuerdings auch durch CF_1 -Gehaltsbestimmungen von inside-out-Vesikeln mittels EID bestätigt (24). Der CF_0 -Teil der photosynthetischen ATP-Synthase sollte, wenn er nur an CF_1 gebunden als CF_1 - CF_0 -Komplex vorkäme, die gleiche heterogene Verteilung wie der CF_1 aufweisen. Nur für den Fall, daß CF_0 gegenüber CF_1 im Überschuß vorläge, wären ungleiche CF_1 - und CF_0 -Verteilungen überhaupt denkbar. Das Vorhandensein von CF_0 ohne gebundenen CF_1 in Chloroplasten ist schon einmal diskutiert worden, wurde aber für unwahrscheinlich gehalten (113). Ein solcher CF_0 würde, so er funktionell intakt wäre, als entkoppelnder H^+ -Kanal wirken, letztlich also die Effektivität des Photosynthese-Apparates vermindern.

		vor			nach		
Phasenverteilung							
Fraktion	Chl a/b	Chl (%)	CF ₀ (%)	CF ₁ (%)	Chl (%)	CF ₀ (%)	CF ₁ (%)
C II	3,05	100	100	100			
YPH	3,08	100	107	105			
40 K	2,95	98	85	86	100	100	100
100 K	7,16	2	5	5			
100 S	-	0	0	4			
T ₂ B	2,71				6	6	5
B ₂ T	3,06				8	7	9
B ₃ T	2,58				6	4	4
T ₂	2,95				57	65	63
B ₃	2,33				8	5	5
Σ		100	90	95	85	87	86

Tab. IV: Chl-, CF₁- und CF₀-Bilanz einer inside-out-Präparation (Kap. VIII. 18.). ¹CF₁- und CF₀-Gehaltsbestimmungen der in 3 % Triton X-100 gelösten Fraktionen durch EID. Die Bezeichnungen der Fraktionen sind im Methodenteil erklärt. EID-Analyse siehe Tab. V.

Fraktion	CF ₀	CF ₁	CF ₀ /CF ₁
	(mm R./3 µg Chl)		
C II	29	38	0,76
YPH	31	40	0,78
40 K	25	33,5	0,75
100 K	78	104	0,75
T ₂ B	23	28,5	0,81
B ₂ T	24	38	0,68
B ₃ T	16,5	24	0,69
T ₂	28,5	37	0,77
B ₃	16,5	21	0,79

Tab. V: Bestimmung von CF₀/CF₁-Verhältnissen in den verschiedenen Fraktionen einer inside-out-Vesikel-Präparation durch EID unter identischen Bedingungen. Alle Membranfraktionen wurden in 3 % Triton X-100 gelöst. Jeweils 3 verschiedene Verdünnungen wurden pro Fraktion in der EID eingesetzt. Auswertung: Die erhaltenen Rocketlängen wurden gegen die Chl-Mengen der 3 Proben aufgetragen und aus der Steigung der Ausgleichsgeraden die Rocketlänge/3 µg Chl berechnet. EID: 30 µl 150-4 (anti-CF₁) bzw. 150 µl 169-4 A (anti-CF₀) pro 10 ml Gel.

Die gleichzeitige Bestimmung von CF_0 und CF_1 in den aus exponierten und nicht exponierten Membranbereichen des Thylakoidsystems stammenden Vesikeln-Fractionen einer i.o.-Präparation mittels EID ermöglicht einen Vergleich von CF_1 - und CF_0 -Verteilung. Die in Tab. IV aufgestellte Bilanz verdeutlicht, daß weder bei der Yeda-Behandlung noch bei Phasen-Verteilung größere Verluste an CF_1 oder CF_0 auftraten, denn Chlorophyll-Bilanz und CF_0 - bzw. CF_1 -Rocketbilanz stimmten jeweils in etwa überein. Das hohe Chl a/b-Verhältnis der 100 K-Fraktion deutet auf einen relativ hohen PS I-Gehalt, das niedrige Chl a/b-Verhältnisse der B_3 -Fraktion (inside-out-Vesikel) auf einen relativ hohen PS II-Gehalt der isolierten Vesikel hin.

Tab. V zeigt, daß die Stromalamellen-Vesikel (100 K) auf Chlorophyll bezogen ca. 5 mal mehr CF_0 ($-CF_1$) enthielten, als die aus den nicht exponierten partition-Bereichen stammenden i.o.-Vesikel (B_3). CF_0 und CF_1 sind also innerhalb des Lamellarsystems heterogen verteilt. Die fast identischen CF_0/CF_1 -Verhältnisse in den verschiedenen Vesikel-Fractionen belegen, daß CF_0 - und CF_1 -Verteilung genau übereinstimmen.

5. Untersuchungen zur Funktion und zur Erreichbarkeit des CF_0 von der Matrixseite der Thylakoidmembran her

Antikörper erwiesen sich als sehr nützliche Werkzeuge bei der Untersuchung von Lokalisation und Funktion einer ganzen Reihe von Komponenten der Chloroplasten-Thylakoidmembran (22). Da die hydrophilen Immunglobuline als membranimpermeable Agentien angesehen werden müssen, kann aus der Reaktion eines Antikörpers mit der Thylakoidmembran geschlossen werden, daß Determinanten des Antigens zugänglich sein müssen. Die Erreichbarkeit einer membrangebundenen Komponente gilt als bewiesen, wenn ein monospezifisches Antiserum die von der Komponente ausgeführte Reaktion oder eine Reaktionssequenz, an der das untersuchte Protein beteiligt ist, hemmt. Der Nachweis von Zugänglichkeit (accessibility) für Antikörper kann auch durch Agglutinationstests oder einfach durch Antikörper-Bingungsteste geführt werden. Mit Hilfe von Antiseren gegen isolierte Untereinheiten ei-

nes membrangebundenen Enzymkomplexes können durch entsprechende Untersuchungen Informationen über die strukturelle Organisation des Protein-Komplexes und die Funktion der verschiedenen Untereinheiten im Komplex gewonnen werden.

Die Untersuchungen am CF_0 -Komplex konzentrierten sich bislang fast ausschließlich auf die Proteolipid-Untereinheit des Komplexes, so daß Informationen über die Rolle der anderen CF_0 -Untereinheiten im CF_0 -Komplex völlig fehlen. Mit Hilfe der produzierten CF_0 -Antiseren soll deshalb versucht werden zu klären, welche Untereinheiten des CF_0 -Komplexes von der Matrixseite bzw. Lumenseite der Thylakoidmembran her für Antikörper zugänglich sind und welche Untereinheiten des CF_0 in dem Bereich des CF_0 , der mit dem CF_1 interagiert, anwesend sind und damit potentiell für eine Funktion bei der CF_1 -Bindung in Frage kommen.

5.1. Einfluß der CF_0 -Antiseren auf die Rückbindung von CF_1 an EDTA-behandelte Membranen

Da der CF_0 das Bindeprotein für den wasserlöslichen CF_1 ist, muß man erwarten, daß er nach Entfernung des CF_1 von der Thylakoidmembran für hydrophile Agentien zugänglich ist. Eine Identifizierung der in EDTA-Membranen zugänglichen Untereinheiten des CF_0 mit Hilfe von Antiseren kann natürlich nur dann gelingen, wenn in den Seren tatsächlich Antikörper gegen die exponierten Determinanten des membrangebundenen CF_0 vorhanden sind. Der folgende Versuch sollte klären, ob diese Voraussetzung bei den von mir hergestellten Antiseren erfüllt war.

Die mit den CF_0 -Komplex-Antiseren 187-A und 169-4 A vorinkubierten EDTA-behandelten Membranen banden deutlich weniger CF_1 zurück als die unbehandelte Kontrolle (Abb. 30). In den Ansätzen mit mehr als 10 μ l 187-A bzw. 25 μ l AS 169-4 A konnte überhaupt keine Rückbindung mehr festgestellt werden; die CF_1 -Konzentration der Überstände der Rückbinde-Ansätze war nach Abzentrifugation der Membranen genauso hoch wie in dem entsprechenden Kontrollansatz ohne Membranen. Die etwas umständlich anmutende Überstandsanalyse - die Messung von rückgebundenem CF_1 in der Membranfraktion mittels EID ist ja prinzipiell ohne weiters mög-

lich (88) - mußte in diesem Experiment durchgeführt werden, da die CF_1 -Rocketanalyse der Membranfraktion in diesem speziellen Fall - auf die Gründe komme ich im nächsten Abschnitt noch zurück - keine korrekten Ergebnisse lieferte. In dem Kontroll-Ansatz wurde nur etwa 40 % (6 μg) des zugegebenen CF_1 (15 μg) zurückgebunden. Kontroll-Chloroplasten enthalten etwa 12,5 μg CF_1 /25 μg Chl, durch EDTA-Behandlung werden etwa 80 % des CF_1 ent-

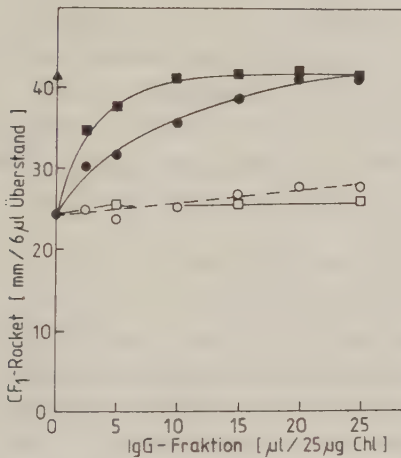


Abb. 30: Einfluß der CF_1 -Antiseren auf die Rückbindung von CF_1 an EDTA-behandelte Membranen. Zu je 20 μl EDTA-behandelte Membranen (1,25 mg Chl/ml in 50 mM Tricin-NaOH pH 8,0, 5 mM ATP, 5 mM EDTA, 25 mM $MgCl_2$, 0,5 % RSA) wurden die angegebenen AS-Mengen (IgG-Fraktion in 10-150, siehe 3.3.1.) gegeben und mit 10-150 auf je 45 μl Volumen aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation bei 4° C wurden 5 μl CF_1 (ca. 3 mg/ml in 40 mM Tricin-NaOH pH 7,8, 2 mM EDTA) zupipettiert und weitere 20 min bei RT inkubiert. Nach Abzentrifugation der Membranen wurde der CF_1 -Gehalt des klaren Überstands durch CF_1 -

Rocketanalyse bestimmt. Die CF_1 -Konzentration in einem entsprechenden Ansatz ohne Chl: 41 mm Rocket/6 μl (▲).

EID: 20 μl 150-4 (anti- CF_1)/10 ml Gel. Symbole: ■ AS 187-A, ● AS 169-4 A, ○ AS 171-4 (anti-III), □ AS 160-6 (anti-FNR)

fernt (88). EDTA-behandelte Chloroplasten besitzen also pro 25 μg Chl freie Bindungsstellen für etwa 10 μg CF_1 . Trotz ausreichender CF_1 -Menge sind also nicht alle Bindungsstellen für CF_1 besetzt worden, dazu ist in der Regel ein mindestens 5-facher CF_1 -Überschuß notwendig (88). Da bei hohem CF_1 -Überschuß in den Überständen der Rückbinde-Ansätze nach Abzentrifugation der Membranen nur relativ kleine Konzentrationsänderungen erwartet werden konnten, wurde in dem in Abb. 30 dargestellten Experiment eine die Rückbindung nicht sättigende CF_1 -Menge eingesetzt, um die von den Seren ausgeübten Effekte besser demonstrieren zu können.

Das Antiserum gegen die Proteolipid-Untereinheit des CF_0 hemmte in dem getesteten Konzentrationsbereich die Rückbindung des CF_1 allenfalls geringfügig, obwohl ein durch Ammoniumsulfat-Fällung bis 45 % Sättigung konzentriertes (2 x) IgG-Präparat des AS 171-4 eingesetzt wurde.

Das AS 160-6 (anti-FNR), das ebenso wie die CF_0 -Antiseren eine starke Aggregation der EDTA-behandelten Membranen bewirkte, hemmte die Rückbindung des CF_1 nicht. Deshalb ist auszuschließen, daß die beobachtete Hemmung der Rückbindung des CF_1 durch die CF_0 -Antiseren die Folge einer von unentdeckt gebliebenen, nicht gegen CF_0 gerichteten Antikörpern bewirkten Aggregation der EDTA-behandelten Membranen war. Man muß also folgern, daß die Hemmung der Rückbindung des CF_1 durch CF_0 -Antikörper verursacht wurde.

5.2. Vorinkubation von Thylakoidmembranen mit CF_0 -Antiserum; Einfluß auf die CF_1 -(CF_0)-Rocketlänge

Experimente, in denen der Einfluß der CF_0 -Antiseren 187-A und 169-4 A auf die Rückbindung des CF_1 an EDTA-behandelte Membranen durch Messung des CF_1 -Gehaltes der Membranfraktion mittels EID untersucht wurde, erbrachten folgende Ergebnisse:

- a. Im Vergleich zur Kontrolle wiesen die mit CF_0 -Antiserum vorinkubierten EDTA-behandelten Membranen deutlich geringere CF_1 -Rocketlängen auf.
- b. Bei genügend großer CF_0 -Antiserummenge unterschritt der durch EID gemessene CF_1 -Gehalt der Membranen sogar den CF_1 -Restgehalt der eingesetzten EDTA-behandelten Membranen.

Aus diesen Resultaten wurden zunächst folgende Schlußfolgerungen gezogen: In den Seren enthaltene CF_0 -Antikörper hemmen die Rückbindung des CF_1 an EDTA-behandelte Membranen und verdrängen sogar die durch die EDTA-Behandlung nicht von der Membran abgelösten CF_1 -Moleküle. Um diesen Verdrängungseffekt näher zu untersuchen, wurden Kontroll-Chloroplasten mit einem CF_0 -Antiserum inkubiert, abzentrifugiert, gewaschen und nach Auflösen der Membranen CF_1 - CF_0 -Gehalt von Membranfraktion und Inkubations-Überstand durch EID bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 zusammengestellt.

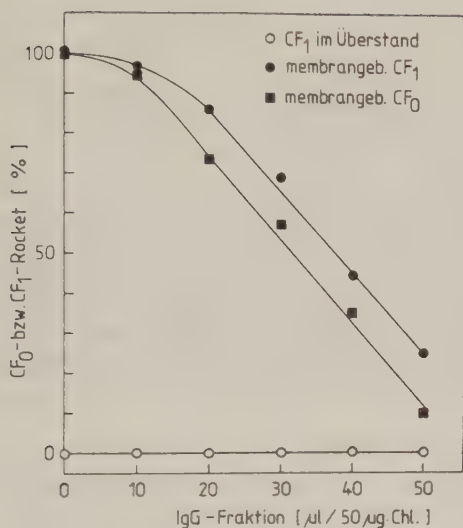


Abb. 31: Abhängigkeit der in Membranfraktion und Überstand durch EID bestimmten CF_1 -(CF_0)-Menge von der Antiserummenge bei der Vorinkubation.

100 µl Ansatz enthielten: 50 µl Kontroll-Chloroplasten (1 mg/ml), 20 mM Tricin-NaOH pH 8, 2 mM ATP, 2 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0,2 % RSA und die angegebenen Antiserummengen (169-4 A, anti- CF_0). Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Membranen in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und für die EID-Analyse aufgehoben. Die Sedimente wurden 2 x gewaschen (siehe VIII.19.) und nach Auflösen in 3 % Triton X-100 ebenso wie die Überstände auf CF_1 - und CF_0 -Gehalt überprüft. Kontrollwer-

te (100 %): 21,75 mm CF_1 -Rocket bzw. 14 mm CF_0 -Rocket/3 µg Chl. EID: 20 µl 150-4 (anti- CF_1) bzw. 120 µl 169-4 A (anti- CF_0)/10 ml Gel

Obwohl die CF_1 - und merkwürdigerweise auch die CF_0 -Rocketlängen der mit CF_0 -Antiserum inkubierten Kontroll-Chloroplasten abnehmen, konnte im Überstand absolut kein CF_1 nachgewiesen werden. Eine durch CF_0 -Antikörper verursachte CF_1 -Verdrängung von der Membran fand also nicht statt. Die gemessenen CF_1 und sicherlich auch die CF_0 -Rocketlängen gaben in diesem speziellen Experiment den CF_1 - bzw. CF_0 -Gehalt der Membranen nicht korrekt wieder. Die CF_1 -Rocketlänge von isoliertem CF_1 wurde durch CF_0 -Antiserum nicht beeinflusst (Tab. VI). Dagegen bewirkten CF_1 -Antiseren in Kontroll-Chloroplasten - ganz ähnlich wie das CF_0 -Antiserum - eine scheinbare Verminderung des CF_1 - und CF_0 -Gehaltes der Membranen. Wie ist das Phänomen zu erklären?

CF_1 -Antikörper können zweifelsohne an den auf der Matrix-Seite der Thylakoidmembran lokalisierten CF_1 binden. Löst man mit anti- CF_1 vorinkubierte Membranen in Triton X-100 auf und setzt die Lösung zur CF_1 -Rocketanalyse ein, so liegen ja bereits beim Start der Elektrophorese Antigen-Antikörper-Aggregate in der Probe vor, die entweder nicht mehr in das Agarosegel eindringen

$\mu\text{l AS 169-4 A}$ $25 \mu\text{g CF}_1$	0	10	20	30	45
$\text{mm CF}_1\text{-Rocket}$ $6 \mu\text{l}$	25,3	25	25,8	27	25,5

Tab. VI. Einfluß von CF_0 -Antiserumzugabe zu isoliertem CF_1 auf die CF_1 -Rocketlänge. Die Ansätze enthielten in 100 μl : 25 μg isolierter CF_1 , die angegebenen Antiserummengen (169-4 A, anti- CF_0) sowie 20 mM Tricin-NaOH pH 8, 2 mM ATP, 2 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 und 0,2 % RSA. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden je 6 μl der Ansätze ohne weitere Behandlung zur CF_1 -Rocketanalyse eingesetzt. Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. EID: 20 μl 150-4 (anti- CF_1)/10 ml Gel. Anmerkung: Das CF_0 -Antiserum/ CF_1 -Verhältnis wurde ganz ähnlich wie in Abb. 31 eingestellt (50 μg Chl $\hat{=}$ 25 μg CF_1).

können oder zur Erreichung der zur Präzipitation notwendigen Aggregatgröße nur noch eine kürzere Laufstrecke in dem CF_1 -Antikörper-haltigen Gel zurücklegen müssen als das Antigen ohne vorgebundene Antikörper. Die beobachtete, durch CF_0 -Antiserum verursachte CF_0 - bzw. CF_1 - "Rocketverkürzung" (Abb. 31) muß also als Hinweis darauf aufgefaßt werden, daß CF_0 -Antikörper in Kontroll-Chloroplasten mit dem CF_0 -Teil des ATP-Synthase-Komplexes reagieren können, ohne daß der CF_1 von der Membran verdrängt wird. Das Ergebnis des in Tab. VI. gezeigten Kontroll-Experimentes schließt aus, daß in dem CF_0 -Serum eventuell noch enthaltene, mit isoliertem CF_1 reagierende Antikörper für den Effekt verantwortlich sind.

Durch Inkubation von isolierten Lamellarsystemen mit Antiserum und nachfolgender Rocketanalyse der gewaschenen und aufgelösten Membranen lassen sich also Informationen über die Erreichbarkeit von membrangebundenen Antigenen gewinnen. Der Rocket-"Verkürzungstest" ist letztlich ein Antikörper-Bindungstest, dessen Vorteile in hoher Empfindlichkeit - bereits 2 μl AS 150-4 (anti- CF_1) pro 50 μg Chl bewirkten in dem in Abb. 31 beschriebenen System 30 % Rocketverkürzung -, geringem Arbeitsaufwand und der Spezifität (Nachweis von Antikörperbindung an das membrangebundene Protein, nicht an die Membran) zu sehen sind.

5.3. Einfluß der CF_0 -Antiseren auf die zyklische Photophosphorylierung

Der im vorigen Abschnitt vorgestellte Antikörper-Bindungstest lieferte Hinweise darauf, daß der CF_0 -Teil des membrangebundenen CF_1 - CF_0 -Komplexes für Antikörper zugänglich ist. Zur Absicherung der gezogenen Schlußfolgerungen wurde untersucht, ob die CF_0 -Antiseren einen Einfluß auf die Photophosphorylierung von isolierten Kontroll-Chloroplasten ausüben (Inhibitions-Test).

Die CF_0 -Komplex-Antiseren 187-A (Abb. 32 A) und 169-3 A (Abb. 32 B) hemmten die Photophosphorylierung in Kontroll-Chloroplasten. Mit AS 187-A war sogar bei nur 10 μ l AS/10 μ g Chl eine fast vollständige Inhibition zu beobachten. Die entsprechenden

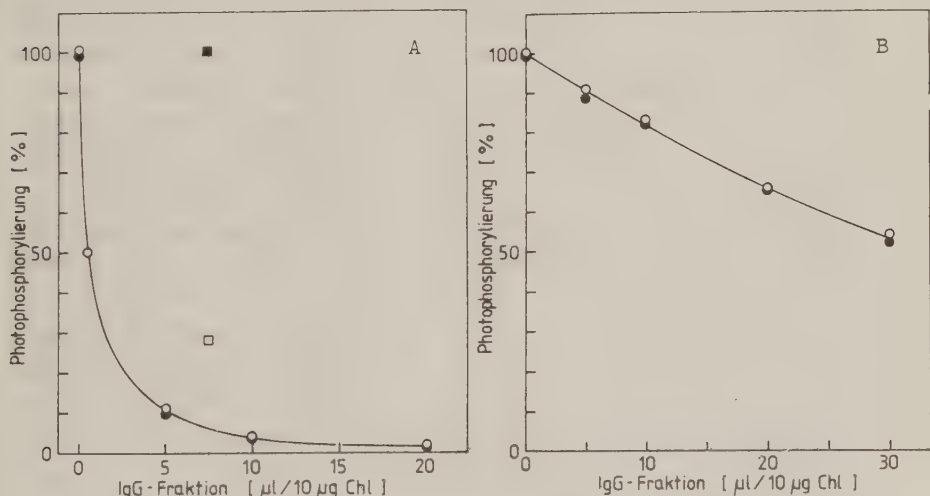


Abb. 32 A,B: Einfluß der CF_0 -Antiseren 187-A (Abb. 32 A) und 169-3 A (Abb. 32 B) auf die Photophosphorylierung; Neutralisation von CF_1 -Antikörpern durch Vorinkubation mit isoliertem CF_1 . Zu 50 μ l CF_1 -Lösung in 40 mM Tricin-NaOH pH 7,8, 2 mM EDTA (ca. 1 mg Protein/ml, entsalzt durch Gelfiltration, siehe VIII.7.) bzw. 50 μ l Puffer wurden die angegebenen Antiserummengen zugegeben, mit Puffer (10-150, siehe 1.3.) auf 80 μ l aufgefüllt und 30 min bei 4° C inkubiert. Danach wurden 720 μ l komplettes Phosphorylierungsmedium (10 μ g Chl) zugegeben und weitere 15 min bei 4° C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml 0,5 mM PMS wurde die Photophosphorylierung wie in Kap. VIII.9. beschrieben gemessen. Kontrollwert (100 %) für A und B: 1309 μ mol ATP/mg Chl x h. Offene Symbole: Vorinkubationsansätze ohne CF_1 . Geschlossene Symbole: Vorinkubation mit CF_1 .
 □ ■ : AS 150-4¹ (anti- CF_1), ○ ● : AS 187-A bzw. 169-4A (anti- CF_0)

Kontrollseren hemmten die ATP-Bildung nicht. 50 % Hemmung wurden durch 30 μl AS 169-3 A bzw. ca. 1 μl AS 187-A bewirkt. Durch Vorinkubation der CF_0 -Antiseren mit isoliertem CF_1 konnten die Inhibitionen nicht einmal teilweise aufgehoben werden, obwohl die zugesetzte CF_1 -Menge ausreichte, die hemmenden CF_1 -Antikörper aus 7,5 μl CF_1 -Antiserum komplett zu neutralisieren (Abb. 32 A). Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die beobachtete Hemmung der Photophosphorylierung nicht durch unentdeckt gebliebene, mit isoliertem CF_1 reagierende CF_1 -Antikörper, sondern wahrscheinlich durch CF_0 -Antikörper verursacht wurde.

Auch das Antiserum gegen die isolierte Proteolipid-Untereinheit des CF_0 bewirkte eine Hemmung der Photophosphorylierung. Auf

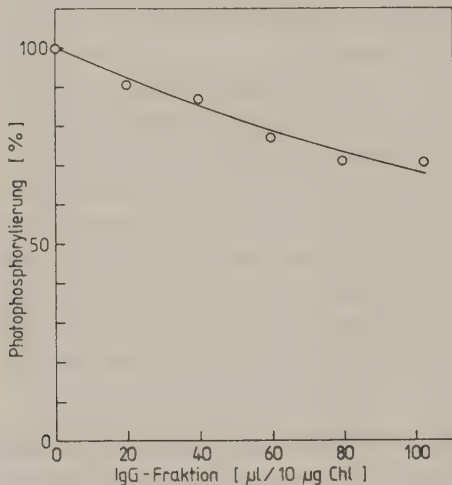


Abb. 33: Einfluß des Proteolipid-Antiserums 171-4 auf die Photophosphorylierung.

Zu den angegebenen, mit 10-150-Puffer auf 100 μl aufgefüllten Antiserummenngen (IgG-Fraktion in 10-150-Puffer) wurden je 700 μl komplettes Phosphorylierungsmedium zugegeben und 20 min bei 4° C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml 0,5 mM PMS wurde die Photophosphorylierung wie in Kap. VIII.9. beschrieben gemessen. Kontrollwert (100 %): 1314 $\mu\text{mol ATP}/\text{mg Chl} \times \text{h}$.

Volumen gezogen war die Hemmwirkung allerdings nur sehr gering. Da das Antiserum neben Antikörpern gegen CF_0 -Untereinheit III auch ϵ -Antikörper enthielt (Kap. 3.4.), kann aus der beobachteten Hemmung der PSP nicht auf eine Zugänglichkeit der Proteolipid-Untereinheit des CF_0 geschlossen werden. Ob die Hemmung überhaupt auf Antikörpereinwirkung zurückgeführt werden kann, wird im nächsten Abschnitt noch untersucht.

5.4. Absorption der hemmenden Antikörper aus den CF_0 -Antisera durch Vorinkubation mit Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten

CF_1 -Antisera sind in der Regel potente Inhibitoren der Photophosphorylierung (58, 59, 67, 99) enthalten also hemmende CF_1 -Antikörper. Da die CF_0 -Antisera aus CF_1 -Antikörper-haltigen Antisera hergestellt wurden, muß sehr sorgfältig geprüft werden, ob die von den CF_0 -Antisera bewirkten Inhibitionen zweifelsfrei durch CF_0 -Antikörper und nicht durch CF_1 -Antikörper im CF_0 -Antiserum verursacht wurden. Das in Abb. 32 gezeigte Neutralisationsexperiment scheint auf den ersten Blick auszuschließen, daß in den CF_0 -Antisera noch enthaltene CF_1 -Antikörper für die Hemmung der Photophosphorylierung verantwortlich sein können. Es muß aber bedacht werden, daß in den Sera noch CF_1 -Antikörper vorhanden sein könnten, die mit isoliertem CF_1 nicht absorbiert werden können, aber möglicherweise mit membran-gebundenem CF_1 reagieren. Im CF_0 -Antiserum 187-A konnten ja in der Tat durch Immunoblotting-Analyse Antikörper gegen die β -Untereinheit des CF_1 nachgewiesen werden (Abb. 19), die durch die in Kap. 1.3. beschriebene Absorptionsprozedur nicht entfernt werden konnten. Wenn nun membrangebundener CF_1 eine etwas andere Konformation besäße als isolierter CF_1 - vielleicht unwahrscheinlich, aber nicht völlig auszuschließen - so könnten unter Umständen die im AS 187-A enthaltenen β -Antikörper mit dem an die Membran gebundenen CF_1 reagieren und die ATP-Bildung hemmen. Das Ergebnis des in Abb. 34 dargestellten Experimentes schließt aber sicher aus, daß die Hemmung der Photophosphorylierung durch irgendwelche noch im CF_0 -Antiserum vorhandenen CF_1 -Antikörper verursacht wird. Wenn nämlich CF_1 -Antikörper für die Hemmung der ATP-Bildung verantwortlich wären, müßte man erwarten, daß für die vollständige Absorption der hemmenden Antikörper deutlich weniger Kontroll- als EDTA-behandelte Chloroplasten benötigt würden, denn Kontroll-Chloroplasten enthalten ja auf Chl bezogen etwa viermal mehr CF_1 als EDTA-behandelte Membranen. Gemäß Abb. 34 verlaufen die Absorptionskurven mit EDTA-behandelten und Kontroll-Chloroplasten aber absolut identisch. Da außer CF_1 und CF_0 nur PS I an der gemessenen Reaktion beteiligt ist und ein Vorhandensein von PS I-Antikörpern sicher ausgeschlossen

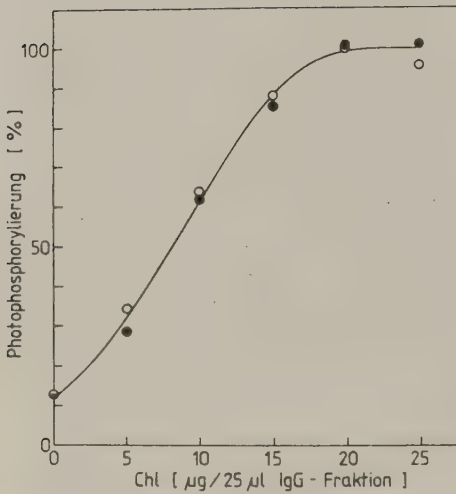


Abb. 34: Absorption der hemmenden Antikörper aus dem CF₁-Antiserum 187-A durch Vorinkubation mit Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten. Die Absorptions-Ansätze enthielten in 75 µl Volumen: 25 µl AS 187-A (1:10 verdünnt) bzw. 25 µl 10-150-Puffer (100 %-Kontrolle), 17 mM Tricin-NaOH pH 8, 83 mM NaCl, 3,3 mM MgCl₂ und die angegebenen Mengen an Kontroll-Chloroplasten bzw. EDTA-behandelten Membranen. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Membranen in der Eppendorff-Zentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände ($\approx$ absorbierte Antiseren) wurden zu je 725 µl komplett

PSP-Medium pipettiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml 0,5 mM PMS wurde die PSP-Aktivität wie in Kap. VIII. 9. beschrieben gemessen. Kontrollwert (100 %): 1413 µmol ATP/mg Chl x h.

- : Absorption mit Kontroll-Chloroplasten
- : Absorption mit EDTA-behandelten Chloroplasten

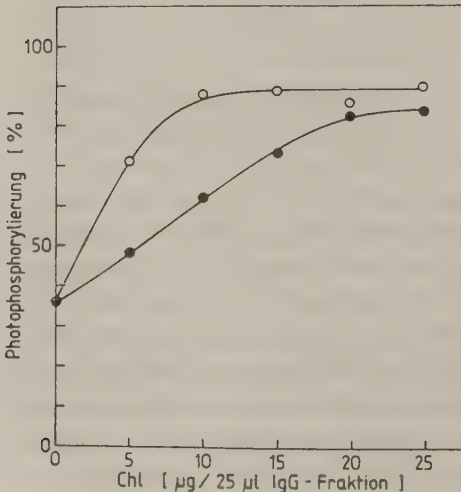


Abb. 35: Absorption der hemmenden Antikörper aus dem CF₁-Antiserum 169-3A durch Vorinkubation mit Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten. Die Absorption von je 25 µl AS-169-3 A mit den angegebenen Chl-Mengen und die Messung der Photophosphorylierung wurden wie in Abb. 34 beschrieben durchgeführt. Kontrollwert (100 %): 1413 µmol ATP/mg Chl x h.

Die in Abb. 34 u. 35 gezeigten Experimente wurden parallel durchgeführt.

- : Absorption mit Kontroll-Chloroplasten
- : Absorption mit EDTA-behandelten Chloroplasten

werden kann, muß die Hemmung der Photophosphorylierung durch CF_0 -Antikörper verursacht worden sein; folglich müssen Determinanten des CF_0 in Kontroll-Chloroplasten für CF_0 -Antikörper erreichbar sein. Auch die Hemmung der Photophosphorylierung durch AS 169-3 A konnte durch Vorinkubation des Serums mit Kontroll- bzw. EDTA-Membranen fast vollständig aufgehoben werden (Abb. 35). Etwa 10 % Hemmung waren durch Vorinkubation mit Membranen nicht neutralisierbar, wurden also nicht durch Antikörper bewirkt. Wodurch diese unspezifische Hemmung verursacht wurde, konnte nicht geklärt werden. Im Gegensatz zum AS 187-A (Abb. 34) mußten zur kompletten Absorption der hemmenden Antikörper aus AS 169-4 A wesentlich mehr EDTA-behandelte Chloroplasten als Kontroll-Chloroplasten eingesetzt werden. Nach den vorstehend ausgeführten Überlegungen könnte das bedeuten, daß im AS 169-3 A noch vorhandene CF_1 -Antikörper für die Hemmung der Photophosphorylierung verantwortlich sind. Muß es das aber auch bedeuten ?

Angenommen, das AS 169-3 A enthielte neben CF_0 -Antikörpern, die in Kontroll-Chloroplasten an den CF_0 binden können und auch hemmen (CF_0 -Antikörper Typ A, Abb. 36), noch CF_0 -Antikörper gegen die für die Bindung des CF_1 verantwortlichen Strukturen

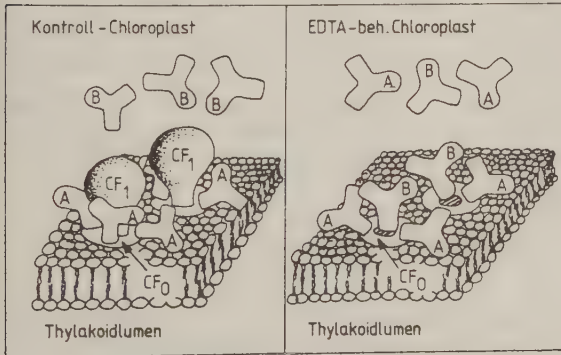


Abb. 36: Absorption von CF_0 -Antikörpern mit EDTA-behandelten und Kontroll-Chloroplasten (Schema). Antikörper - Typ A kann in EDTA-behandelten u. Kontroll-Chloroplasten binden und PSP in Kontroll-Chloroplasten hemmen. Antikörper-Typ B bindet nur in EDTA-behandelten Membranen an den CF_0 , da er gegen die Bindungsfläche bzw. gegen nah an die Bindungsfläche

angrenzende, für Typ A-Antikörper in Kontroll-Chloroplasten nicht zugängliche Bereiche des CF_0 gerichtet ist (vereinfacht Bindungsflächen-Antikörper). Annahme: maximal 3 Antikörper können pro CF_0 binden.

(CF_0 -Bindungsflächen-Antikörper, Typ B, Abb. 36), so könnte der Mehrbedarf an EDTA-behandelten Chloroplasten für vollständige Absorption der hemmenden CF_0 -Antikörper (Typ B) folgendermaßen erklärt werden (Abb. 36 veranschaulicht diese Hypothese):

Nur in EDTA-behandelten Membranen können auch die CF_0 -Bindungsflächen-Antikörper (Typ B) mit dem CF_0 reagieren und vielleicht aufgrund sterischer Hinderung die Bindungsmöglichkeiten für Typ A-Antikörper - nur diese Antikörper können die PSP hemmen - einschränken. Folglich müssen für die Absorption aller Typ A-Antikörper mehr EDTA-behandelte als Kontroll-Chloroplasten eingesetzt werden.

Mit dem in Abb. 37 dargestellten Experiment wurde diese Hypothese überprüft. Zunächst wurden alle hemmenden Antikörper (CF_0 -Antikörper Typ A und sicher auch eventuell vorhandene CF_1 -Antikörper) aus AS 169-3 A durch Absorption mit einem Überschuß an Kontroll-Chloroplasten entfernt. Die Zugabe dieses absorbier-

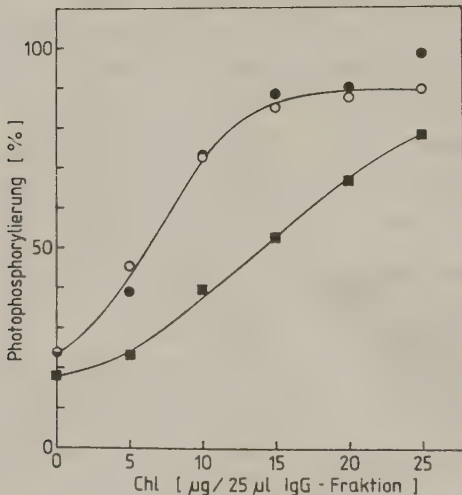


Abb. 37: Einfluß von Typ B-Antikörpern aus AS 169-3A auf die Absorption der hemmenden Antikörper aus AS 187-A.

Zunächst wurden 150 µl AS 169-3A mit 300 µl Kontroll-Chloroplasten (0,5 mg Chl/ml) in 20 mM Tricin-NaOH pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ 20 min bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugation der Membranen wurde der Überstand abgenommen und aufgehoben (25 µg Chl/25 µl AS 169-3A reichen nach Abb. 35 für eine vollständige Absorption aller Typ A-Antikörper sicher aus). Die Absorption von je 25 µl AS 187-A (1:10 verdünnt) mit den angegebenen Mengen an EDTA-behandelten (●) bzw. Kontroll-Chloroplasten (○) sowie die Absorption von je

25 µl AS 187-A (1:10 verdünnt) + 22 µl mit Kontroll-Chloroplasten absorbiertem AS 169-3 A (s.o.; 67 µl Überstand $\approx$ 22 µl AS 169-3A) mit den angegebenen Mengen an EDTA-behandelten Membranen (■) erfolgte in 142 µl Volumen unter den in Abb. 34 beschriebenen Bedingungen. Nach Abzentrifugation der Membranen wurden die Überstände zu je 660 µl komplettem PSP-Medium gegeben und nach 20 min Inkubation auf Eis die PSP-Aktivität bestimmt (Kap. VIII.9.). Kontrollwert (100 %): 1046 µmol ATP/mg Chl x h.

ten Antiserums zum AS 187-A bewirkte, daß für die Absorption der hemmenden CF_0 -Antikörper aus AS 187-A nun deutlich mehr EDTA-behandelte Membranen eingesetzt werden mußten (Abb. 37). Dieses Ergebnis beweist die oben aufgestellte Hypothese, daß mit Kontroll-Chloroplasten nicht absorbierbare CF_0 -Antikörper (Typ B) und nicht CF_1 -Antikörper für den größeren EDTA-Chl-Bedarf bei der Absorption der hemmenden CF_0 -Antikörper (Typ A) aus AS 169-3 A (Abb. 35) verantwortlich sind. Das Verhältnis von hemmenden Antikörpern (Typ A) zu Bindungsflächen-Antikörpern (Typ B) - so folgt aus den Ergebnissen (Abb. 34 u. 35) - muß in AS 187-A sehr viel höher sein als in AS 169-3 A.

Wie Abb. 38 zeigt, konnte die durch Proteolipid-Antiserum 171-4 verursachte Hemmung der Photophosphorylierung nicht durch Vorinkubation mit Kontroll-Chloroplasten aufgehoben werden. Sie

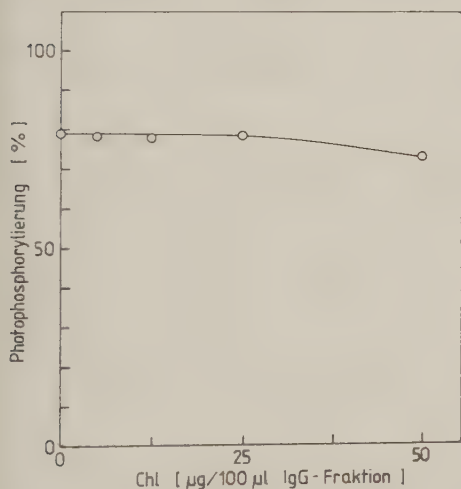


Abb. 38: Einfluß von Vorinkubation mit Kontroll-Chloroplasten auf die Hemmung der PSP durch AS 171-4. Zu je 100 µl AS 171-4 wurden die angegebenen Mengen an Kontroll-Chloroplasten zugegeben. In 200 µl Volumen betragen die Konzentrationen dann: 15 mM Tricin-NaOH pH 8, 100 mM NaCl und 2,5 mM $MgCl_2$. Nach 20 min Inkubation bei 4°C wurden die Membranen abzentrifugiert und der Überstand zu 600 µl komplettem PSP-Medium zupipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Messung der PSP wie in Kap. VIII. 9. beschrieben. Kontrollwert (100 %): 1226 µmol ATP/mg Chl x h.

wurde also nicht durch an den CF_1 - CF_0 -Komplex bindende Proteolipid-Antikörper oder ϵ -Antikörper (Kap. 3.4.) bewirkt und ist deshalb als unspezifisch zu bezeichnen. Aus der beobachteten Inhibition der Photophosphorylierung darf daher nicht auf eine Erreichbarkeit des Proteolipids im membrangebundenen CF_1 - CF_0 -Komplex geschlossen werden. Nicht-Erreichbarkeit läßt sich durch dieses negative Ergebnis (keine spezifische Hemmung) allerdings

auch nicht beweisen; möglicherweise enthielt das Serum gerade gegen exponierte Anteile des Proteolipids keine Antikörper. Das Ergebnis kann ebenso nicht belegen, daß keine Proteolipid-Antikörper gebunden hatten, denn vielleicht hemmen gebundene Antikörper gegen III die Aktivität des CF_1 - CF_0 nicht. Proteolipid-Antikörper-Bindung an CF_0 in Kontroll-Chloroplasten konnte allerdings auch mit Hilfe des Rocket-"Verkürzungstests" nicht nachgewiesen werden. Die CF_0 -Rocket (AS 169-4 A) von Kontroll-Chloroplasten wurde durch Vorinkubation der Membranen mit Proteolipid-Antiserum nicht beeinflusst. Da das Serum auch die Rückbindung von CF_1 an EDTA-behandelte Chloroplasten nicht hemmte (Abb. 30), geben die mittels des AS 171-4 durchgeführten Untersuchungen keinen Aufschluß darüber, ob Teile der Proteolipid-Untereinheiten des CF_0 -Komplexes in Kontroll-Chloroplasten für Antikörper zugänglich sind bzw. nach Entfernung des CF_1 zugänglich werden.

5.5. Einfluß der CF_0 -Antiseren auf die H^+ -Aufnahme in Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten

Die bisher erarbeiteten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß CF_0 -Antikörper die Photophosphorylierung in Kontroll-Chloroplasten hemmen können. Da der CF_0 -Komplex die H^+ -Translokation aus dem Thylakoidlumen zum CF_1 katalysiert, liegt die Vermutung nahe, daß die CF_0 -Antikörper die H^+ -Translokation in irgendeiner Weise beeinflussen. Um dies zu überprüfen, wurde untersucht, ob die CF_0 -Antiseren einen Einfluß auf die mittels pH-Elektrode im Suspensionsmedium von isolierten Chloroplasten-Lamellarsystemen meßbaren lichtinduzierten pH-Änderungen (53, 82) haben.

Alle drei untersuchten Antiseren (IgG-Fraktionen in 10-150) beeinflussten den "extent" in Kontroll-Chloroplasten nicht (Abb. 39 und 40), die geringfügige Erniedrigung muß auf Alterungsprozesse zurückgeführt werden (lange Versuchsdauer). Die in EDTA-behandelten Chloroplasten stark erniedrigte H^+ -Aufnahme - es konnte sogar eine Ansäuerung des Mediums beobachtet werden, ein Effekt, der nur in stark entkoppelten Membranen auftritt (93) - wurde sowohl durch AS 187-A (Abb. 39) als auch durch AS 169-3 A (Abb. 40) beträchtlich stimuliert, während AS 171-4 (Abb. 40) keinen Effekt bewirkte.

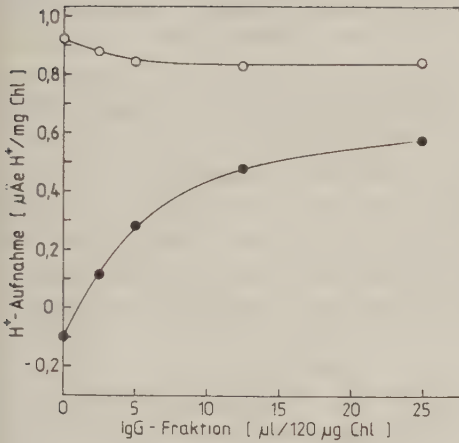


Abb. 39: Einfluß des CF_0 -Antiserums 187-A auf den "extent" der H^+ -Aufnahme bei pH 6,5 in Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Membranen. Die Membranen (120 µg Chl) wurden in der Meßzelle bei 15 °C 5 min lang mit den angegebenen Serummengen im kompletten Ansatz bei pH 7 inkubiert. Durch Zugabe von 0,01 n HCl wurde der pH dann auf 6,5 eingestellt und die H^+ -Aufnahme wie in Kap. VIII.15. beschrieben gemessen. Die eingesetzten EDTA-behandelten Chloroplasten wurden unter Standardbedingungen (ohne Salzschutz) isoliert.
○ : Kontroll-Chloroplasten
● : EDTA-behandelte Chloroplasten

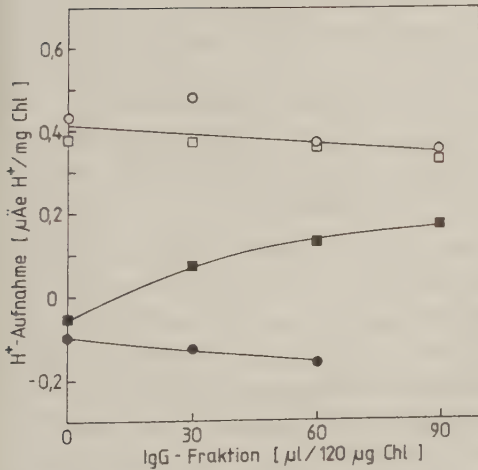


Abb. 40: Einfluß des CF_0 -Antiserums 169-3 A und des Proteolipid-Antiserums 171-4 auf den "extent" der H^+ -Aufnahme bei pH 6,5 in Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten. Durchführung und Bedingungen wie in Abb. 39.
○ ● : AS 171-4
□ ■ : AS 169-3 A
Offene Symbole: Kontroll-Chloroplasten
Geschlossene Symbole: EDTA-behandelte Chloroplasten

Wie kann dieses Ergebnis erklärt werden? Der "extent" der H^+ -Aufnahme gibt ja die Menge an H^+ an, die bei kontinuierlicher Belichtung im Gleichgewichtszustand aus dem Medium in die Thylakoidmembranen transportiert worden ist. Der Gleichgewichtszustand, der nach etwa 20 sec erreicht wird (Abb. 41), ist das Ergebnis von zwei gegenläufigen, sich kompensierenden Protonen-

flüssen. Der durch vektoriellen Elektronentransport erzeugte H^+ -influx wird durch gleichstarken H^+ -efflux ausgeglichen, so daß kein netto-influx mehr beobachtet werden kann. Die Stimulierung des "extents" der H^+ -Aufnahme in EDTA-behandelten Chloroplasten durch die CF_0 -AS 187-A und 169-3 A kann, da eine Stimulierung des H^+ -influxes (Elektronentransports) wohl ausgeschlossen werden kann, nur durch eine Verminderung des H^+ -effluxes zustande kommen. Die CF_0 -Antikörper hemmen also - ob Typ A oder B geht aus diesem Experiment nicht hervor, da beide Antikörper-Typen reagieren können - den in EDTA-Chloroplasten stark beschleunigten H^+ -efflux durch CF_0 .

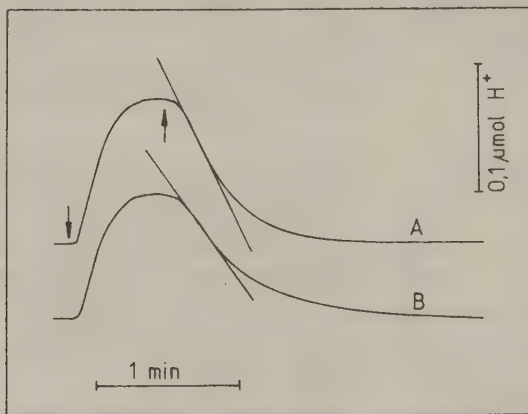


Abb. 41: Einfluß des AS 187-A auf den pH-Abfall im Suspensionsmedium von isolierten Lamellarsystemen (Kontroll-Chloroplasten) nach Abschalten des Lichts. Verkleinerte Schreiberprotokolle zweier Messungen aus Abb. 39.
A: Kontrolle, 0,92 $\mu Ae H^+/mg Chl$
B: 25 μl AS 187-A/ 120 μg Chl, 0,83 $\mu Ae H^+/mg Chl$

Der in den ersten Sekunden nach Abschalten des Lichts (kein H^+ -influx mehr) zu beobachtende pH-Abfall, der ein Maß für die H^+ -Permeabilität der Membranen ist, war in den mit CF_0 -AS behandelten Kontroll-Chloroplasten deutlich verlangsamt (Abb. 41). Die CF_0 -Antikörper, die in Kontroll-Chloroplasten an den CF_0 binden können (Typ A), hemmen also den H^+ -efflux durch CF_0 . Unterstützt wird diese Schlußfolgerung durch den Befund, daß AS 187-A, das ja nur relativ wenig Typ B-Antikörper enthielt, sehr viel effektiver als AS 169-3 A die H^+ -Aufnahme in EDTA-behandelten Chloroplasten stimulierte (Abb. 39 u. 40). Ob auch die Bindungsflächen-Antikörper (Typ B) den H^+ -efflux durch CF_0 hemmen können, kann aus den bislang vorgestellten Experimenten nicht

abgeleitet werden. Das Problem wird im nächsten Abschnitt untersucht.

5.6. Einfluß der CF_0 -Antiseren auf die Photophosphorylierung in EDTA-behandelten Chloroplasten

Die Untersuchung des von Typ B-Antikörpern ausgeübten Effektes auf den H^+ -efflux erwies sich in dem in Abb. 39 vorgestellten System (H^+ -Aufnahme) als problematisch, da die durch die Absorption der Seren mit Kontroll-Chloroplasten eingeschleppten Puffermengen die Pufferkapazität der Meßansätze beträchtlich erhöhten und damit die Empfindlichkeit der Methode erniedrigten. Um Dialysen zu vermeiden und auch um Antiserum zu sparen - bei der H^+ -Aufnahme-Messung werden 120 μg Chl/Ansatz eingesetzt - wurde deshalb ein anderes Test-System gewählt.

Durch EDTA-Behandlung mit 3,5 mM "Salzschutz" werden 20 - 30 % des CF_1 von der Membran entfernt (26); damit sind 20 - 30 % der in diesen Membranen enthaltenen CF_0 -Moleküle für Typ B-Antikörper zugänglich. Die Photophosphorylierungskapazität (PMS-System) dieser Membranen ist mit etwa 50 % niedriger als der prozentuale CF_1 -Gehalt, weil bedingt durch den beschleunigten, nicht an ATP-Bildung gekoppelten H^+ -efflux durch die CF_0 -Moleküle, die keinen CF_1 mehr gebunden haben, die noch verbliebenen CF_1 -Moleküle nicht mehr optimal mit H^+ versorgt werden.

Erwartungsgemäß hemmten die nichtabsorbierten CF_0 -Antiseren 187-A und 169-4 A auch die ATP-Bildung in solchen EDTA-behandelten Chloroplasten (Abb. 42 A,B). Im Gegensatz zu den streng hyperbolen Hemmkurven, die mit Kontroll-Chloroplasten erhalten wurden (Abb. 32 B), verliefen die Hemmkurven mit EDTA-behandelten aber sigmoid (Abb. 42 A,B). Mit AS 169-4 A konnte bei geringen Antiserummengen sogar eine deutliche Stimulierung beobachtet werden. Wurden statt der CF_0 -Antiseren entsprechende Mengen an vorher mit Kontroll-Chloroplasten absorbierten CF_0 -Antiseren eingesetzt, so wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- a. Die PSP in Kontroll-Chloroplasten wurde durch die maximal eingesetzten Serummengen nur geringfügig gehemmt.
- b. Die maximal eingesetzte Menge an AS 187-A stimulierte die

mit EDTA-Chloroplasten gemessene PSP um etwa 8 %.

- c. Bereits die geringste eingesetzte Menge AS 169-4 A stimulierte die PSP in EDTA-Chloroplasten von 48 auf 70 % der Kontrollrate.

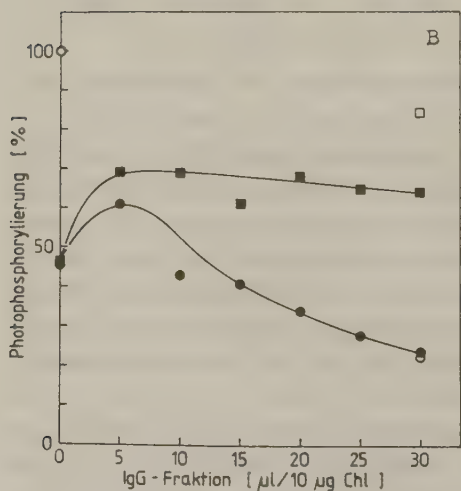
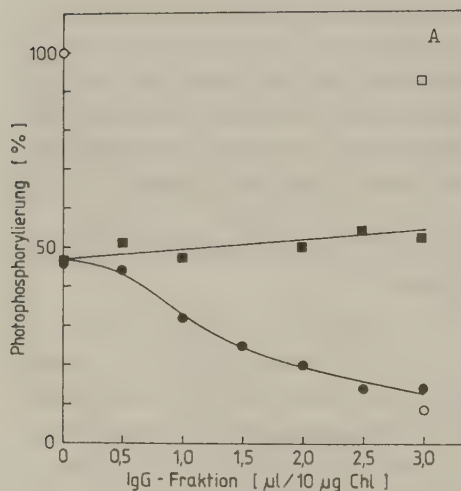


Abb. 42 A,B: Einfluß der CF_0 -Antiseren 187-A (A) bzw. 169-4 A (B) auf die Photophosphorylierung in EDTA-behandelten Chloroplasten. EDTA-Behandlung mit 3,5 mM NaCl "Salzschutz" (Kap. VIII.5.). Absorption der Antiseren mit Kontroll-Chloroplasten: 150 µl AS 169-4 A bzw. 150 µl AS 187-A (1:10 verdünnt) wurden zu 450 µl Kontroll-Chloroplasten (0,67 mg Chl/ml) in 20 mM Tricin-NaOH, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugation wurden die Überstände abgenommen (Typ A-Antikörper-absorbierbare Seren). 40 µl Überstand $\approx$ 10 (169-3 A) bzw. 1 µl (187-A) IgG-Fraktion. Die Inkubation der EDTA-behandelten bzw. Kontroll-Chloroplasten mit den angegebenen Mengen an absorbierten bzw. entsprechend verdünnten nichtabsorbierten Antiseren wurde im kompletten Phosphorylierungsansatz (20 min auf Eis) durchgeführt. Messung der Aktivität: Kap. VIII.9. Kontrollwert (100 %): 938 μ mol ATP/mg Chl x h.

- ● : CF_0 -Antiseren unbehandelt
- ■ : mit Kontroll-Chloroplasten absorbierte CF_0 -Antiseren
- ■ : PSP in EDTA-behandelten Chloroplasten
- □ : PSP in Kontroll-Chloroplasten

Wie kann die beobachtete Stimulierung der Photophosphorylierung in EDTA-Chloroplasten durch die CF_0 -Antiseren, die nur noch Typ B-Antikörper enthalten - siehe Kontrollen in Abb. 42 A,B - erklärt werden? Die Bindung dieser Antikörper bewirkte, daß die verbliebenen CF_1 -Moleküle (70-80 %) wieder mit leicht erhöhter (AS 187-A) bzw. sogar mit der gleichen (AS 169-4 A) Umsatzgeschwindigkeit wie die in den Kontroll-Chloroplasten ATP bilden konnten. Dieser Effekt kann nur dadurch erklärt werden, daß die in EDTA-behandelten Chloroplasten suboptimale Versorgung der CF_1 -Moleküle mit Protonen durch Antikörpereinwirkung wieder verbessert wurde. Typ B-Antikörper, nur sie können verantwortlich gemacht werden, hemmen also ebenso wie die Typ A-Antikörper den H^+ -efflux durch CF_0 , stimulieren dadurch den H^+ -Gradienten über der Membran und damit die ATP-Bildung durch die nach EDTA-Behandlung noch auf der Membran verbliebenen CF_1 -Moleküle.

Die mit den nicht-absorbierten CF_0 -Antiseren erhaltenen sigmoiden Hemmkurven und die im Vergleich zu Kontroll-Chloroplasten prozentual geringere Hemmung (bezogen auf die jeweilige Kontrolle ohne AS-Zugabe) der zyklischen PSP in EDTA-behandelten Chloroplasten (Abb. 42 A,B) können nun einfach dadurch erklärt werden, daß diese Antiseren ja sowohl Antikörpern vom Typ B - die nur stimulieren können - als auch Antikörper vom Typ A - die stimulieren (wenn sie an CF_0 binden) und hemmen können (wenn sie an CF_1 - CF_0 binden) - enthalten. Mitverantwortlich für die sigmoiden Kurvenverläufe ist aber wohl auch der Umstand, daß die Photophosphorylierungsrate in EDTA-Chloroplasten im Gegensatz zur PSP mit PMS in Kontroll-Chloroplasten (24) nicht durch die CF_1 - CF_0 -Menge limitiert wird. Geringe Mengen an hemmenden CF_0 -Antikörpern bewirken in EDTA-Chloroplasten möglicherweise eine relativ geringe prozentuale Hemmung, weil die zurückgestauten Protonen über den H^+ -Pool (Thylakoidlumen) die Photophosphorylierungsrate der nichtgehemmten CF_1 - CF_0 -Moleküle, die ja nicht mit maximaler Geschwindigkeit arbeiten, erhöhen können. In der Tat wurde die Photophosphorylierung (PMS) durch AS 187-A in Kontroll-Chloroplasten bei sättigender Lichtintensität prozentual stärker gehemmt als bei nicht sättigender Intensität.

Die in Abb. 42 A,B dargestellten Ergebnisse bekräftigen den in 5.4. aus den Ergebnissen der Absorptionsexperimente gezogenen Schluß, daß das AS 187-A ein sehr viel höheres Verhältnis von H^+ -efflux hemmenden Typ A-Antikörpern zu Bindungsflächen-Antikörper (Typ B) aufweist als AS 169-3 A. Berücksichtigt man aber, daß das AS 187-A auf Volumen bezogen etwa 20-30 mal effektiver als AS 169-3 A die Photophosphorylierung in Kontroll-Chloroplasten hemmte (Abb. 32 A,B), so ergibt sich, daß auf μl IgG-Fraktion bezogen das mit Kontroll-Chloroplasten absorbierte AS 169-4A nur etwa 2-3x effektiver die PSP in EDTA-behandelten Chloroplasten stimuliert (Abb. 42 A,B) als das entsprechend behandelte Antiserum 187-A, das ja in dem getesteten Konzentrationsbereich eine - wenn auch nur geringe - Stimulierung bewirkte. Da AS 187-A, obwohl es weniger hemmende Typ B-Antikörper enthielt als 169-4A (Abb. 42 A,B) dennoch die Rückbindung des CF_1 stärker hemmte als AS 169-4 A (Abb. 30), bedeutet entweder, daß es relativ mehr nicht H^+ -efflux hemmende Typ B-Antikörper enthielt als 169-4 A oder, diese Möglichkeit halte ich für wahrscheinlicher, daß auch Typ A-Antikörper die Rückbindung des CF_1 durch sterische Hinderung hemmen.

Da beide Antiseren Typ B-Antikörper enthielten, wurden bei Versuchen zur Identifizierung der an der Bindung beteiligten Untereinheiten des CF_0 auch beide Antiseren eingesetzt.

5.7. Identifizierung der für Antikörper zugänglichen CF_0 -Untereinheiten des membrangebundenen CF_1 - CF_0 - bzw. CF_0 -Komplexes

Im AS 187-A konnten durch Immunoblotting-Analyse nur CF_0 -Antikörper gegen Untereinheit II nachgewiesen werden (Abb. 19). Die von diesem Antiserum ausgeübten Effekte - Hemmung der PSP in Kontroll-Chloroplasten (Abb. 32 A) und Stimulierung der PSP in EDTA-behandelten Chloroplasten (Abb. 42 A) - werden also höchstwahrscheinlich (s. Kap. IV) von Antikörpern gegen Untereinheit II verursacht. Hieraus folgt, daß ein Teil von Untereinheit II in Kontroll-Chloroplasten für Antikörper zugänglich ist, ein weiterer Teil des Peptids dagegen erst nach Ablösung des CF_1 zugänglich wird, also in dem von CF_1 verdeckten Bereich

des CF_0 lokalisiert ist. Untereinheit I soll nach einem Vorschlag von NELSON et al. (81) an der Bindung des CF_1 an die Membran beteiligt sein. Das Peptid müßte demnach zumindest in EDTA-behandelten Chloroplasten für Antikörper erreichbar sein. Mit Hilfe eines - leider nicht zur Verfügung stehenden - monospezifischen Antiserums gegen I könnte dies sehr einfach überprüft werden; ein mit Kontroll-Chloroplasten absorbiertes Antiserum gegen I sollte die Rückbindung von CF_1 an EDTA-behandelte Chloroplasten noch hemmen. Im AS 169-3 A konnten zwar Antikörper gegen I nachgewiesen werden, da es aber auch Antikörper gegen II und III enthielt (Abb. 19), können die von diesem Serum ausgeübten Effekte nicht Antikörpern gegen eine bestimmte Untereinheit zugeschrieben werden. Dennoch soll hier ein Weg aufgezeichnet werden, der mit Hilfe dieses Antiserums zur Klärung des Problems führt und weitere Informationen zur strukturellen Organisation des CF_0 liefert.

Die Immunoblotting-Analysen von nichtabsorbiertem CF_0 -Antiserum (hier ein Gemisch aus 169-3 A und 187-A) und entsprechenden Mengen an mit Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten absorbiertem Serum unter identischen Bedingungen ergaben folgende Ergebnisse (Abb. 43):

- a. Durch Absorption mit Kontroll-Chloroplasten nahmen die Antikörpertiter gegen I und II deutlich, die gegen III und β sehr stark ab.
- b. Durch Absorption mit der gleichen Menge an EDTA-behandelten Chloroplasten wurden die Antikörpertiter gegen I und II noch stärker vermindert als durch Absorption mit Kontroll-Chloroplasten.

Für die Absorptionen wurden jeweils etwa 4-5mal mehr Chlorophyll (75 μ g/2,5 μ l AS-Gemisch) eingesetzt, als zur vollständigen Entfernung der hemmenden Antikörper notwendig gewesen wäre. Absorption mit jeweils nur halb so viel Chl ergab ein fast übereinstimmendes Ergebnis, so daß ein hoher Anteil an unspezifischer Absorption der bei pH 8 schwach positiv geladenen Antikörper unwahrscheinlich erscheint. Da ein höherer Anteil an unspezifischer Antikörperbindung bei der Absorption mit EDTA-behandelten Chloroplasten aufgrund der in Abb. 34 u. 35 dargestellten Ergeb-

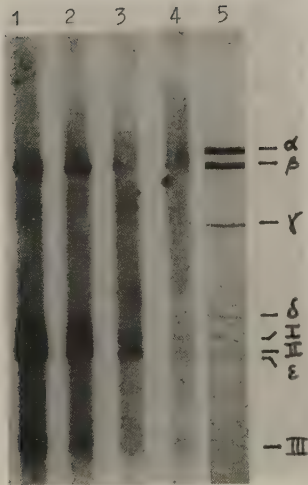


Abb. 43: Immunoblotting-Analyse von nichtabsorbiertem und mit Kontroll- bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten absorbiertem CF₀-Antiserum. Je 10 μ l CF₀-AS (AS 169-3 A u. 187-A, gemischt im Verhältnis 2:3) wurden mit Kontroll-Chloroplasten (300 μ g Chl, Streifen 3) bzw. EDTA-beh. Chloroplasten (300 μ g Chl, Streifen 4) in 20 mM Tricin-NaOH pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 2 mM EDTA, 5 mg RSA/ml (600 μ l Volumen) 1 h bei 4^o C inkubiert. Nach Abzentrifugation der Membranen wurde jeweils ein Viertel des Überstandes ($\approx$ 2,5 μ l AS) für die Immunreaktion verwendet (Kap. VIII.13.4.). Streifen 1 u. 2: 5 bzw. 2,5 μ l nicht absorbiertes CF₀-AS (Die stärkere Reaktion mit 5 μ l AS zeigt, daß die zugegebene AS-Menge der limitierende Faktor war, geringe Titerabnahmen mußten sich also sofort bemerkbar machen). Streifen 5: SDS-Referenzgel mit isoliertem CF₁-CF₀.

nisse ausgeschlossen werden kann (für die Absorption der hemmenden Antikörper werden eher mehr EDTA-beh. als Kontroll-Chloroplasten benötigt), müssen die Resultate folgendermaßen interpretiert werden: Teile der Untereinheiten I, II und III des CF₀ sind in Kontroll-Chloroplasten für Antikörper zugänglich, weitere Teile der Peptide I und II werden erst nach Ablösung des CF₁ zugänglich. Der Befund, daß auch die β -Antikörper absorbierbar sind, widerspricht keineswegs der in 5.4. gezogenen Schlußfolgerung, daß die im AS 187-A enthaltenen β -Antikörper nicht für die Hemmung der Photophosphorylierung verantwortlich sind: Antikörper-Bindung muß nicht unbedingt Inhibition zur Folge haben. Auch ein Antiserum gegen die isolierte β -Untereinheit hemmte die PSP nicht, obwohl es Chloroplasten agglutinierte (78).

Da die Immunoblotting-Methode im eigenen Labor nicht etabliert ist und dieser Versuch praktisch den Abschluß des experimentellen

Teils dieser Arbeit bildete, konnte das Experiment nur zweimal in nicht ganz übereinstimmender Form im Labor von Prof. Hermann (Universität Düsseldorf) durchgeführt werden. Beide Versuche ergaben jedoch hinsichtlich der Absorbierbarkeit von I- und II-Antikörpern gleiche Ergebnisse. Die Absorbierbarkeit der Antikörper gegen Untereinheit III konnte allerdings nur in einem Experiment beobachtet werden, da beim ersten Versuch unglücklicherweise von dem für den elektrophoretischen Transfer benutzten SDS-Gel der das DCCD-Bindungsprotein enthaltende untere Teil abgeschnitten (Gele mußten wegen der Abmessungen der Blot-Zelle verkleinert werden) worden war und das Protein somit auf den für die Immunreaktion benutzen Nitrocellulose-Streifen gar nicht vorhanden war. Das Ergebnis soll daher nur als ein durch weitere Experimente noch abzusichernder erster Hinweis darauf aufgefaßt werden, daß auch Untereinheit III des membran-gebundenen CF_1 - CF_0 -Komplexes für Antikörper zugänglich sein könnte.

6. Untersuchungen zur Erreichbarkeit des CF_0 von der Lumenseite der Thylakoidmembran her

Nach dem von SEBALD & HOPPE (95) vorgeschlagenen "hairpin"-Modell durchspannt die Proteolipid-Untereinheit des CF_0 -Komplexes die Thylakoidmembran, steht also sowohl mit Thylakoidlumen als auch mit CF_1 oder Stroma in Kontakt. Da dieses Modell bislang experimentell nicht bestätigt werden konnte und darüber hinaus völlig unklar ist, ob die CF_0 -Untereinheiten I und II transmembrane Peptide sind, sollte versucht werden zu klären, ob (und welche) Untereinheiten des CF_0 -Komplexes von der Thylakoidlumenseite her für Antikörper erreichbar sind.

Folgende Voraussetzungen waren zunächst zu erfüllen:

- a. Es mußten CF_0 -haltige inside-out Vesikel hergestellt werden.
- b. Um die von den Seren ausgeübten Effekte eindeutig auf mit der Lumenseite des CF_0 reagierende Antikörper zurückführen zu können (i.o.-Vesikel-Fraktionen sind stets durch r.s.o.-Vesikel verunreinigt), mußten alle an der Matrixseite des CF_0 bindenden Antikörper (Typ A u. B) durch Absorption mit EDTA-be-

handelnden Chloroplasten aus dem für die Untersuchungen verwendeten Antiseren entfernt werden (siehe Kap. 6.2.).

- c. Es mußte ein Test ausgewählt werden, mit dem eine Reaktion von CF_0 -Antikörpern mit der Thylakoidlumenseite des CF_0 nachgewiesen werden konnte. Da Inhibitionsteste mit i.o.-Vesikeln unmöglich (PSP) bzw. sehr schwierig sind (H^+ -Abgabe) kam eigentlich nur ein Antikörper-Bindungstest in Frage (s. Kap. 6.2.).

6.1. Präparation von CF_0 enthaltenden inside-out-Vesikeln (i.o.)

In inside-out-Vesikeln ist die Lumenseite der Thylakoidmembran nach außen gekehrt (5), also für die membranimpermeablen Antikörper zugänglich. Die durch Yeda-Press-Behandlung erzeugten Vesikel entstehen aber nur aus gestapelten (nichtexponierten) Bereichen (Grana) des Lamellarsystems (11) in denen kein CF_1 anwesend ist (19, 24, 57, 70). Da CF_0 nur an CF_1 gebunden vorkommt (Kap. 4.5.), enthalten "normale", aus gestapelten Membranen isolierte i.o. folglich überhaupt keinen CF_0 und eigneten sich daher nicht für die geplanten Untersuchungen. Um i.o.-Vesikel, die CF_0 enthalten, präparieren zu können, mußte erst ein Weg gefunden werden, wie der CF_0 in die Bereiche mit engem Membrankontakt hineinmanipuliert werden kann.

Verwandte ich durch Titration auf pH 4,7 (Isoelektrischer Punkt der Thylakoidmembran, 1) aggregierte EDTA-behandelte Thylakoidmembranen als Ausgangsmaterial für die i.o.-Vesikelpräparation und untersuchte Chl a/b-Verhältnis, CF_0 -Gehalt und die CF_1 -Rückbindefähigkeit der T_2 -(r.s.o.) und B_2 -Fraktion (i.o.), so erhielt ich folgende Ergebnisse (Abb. 44):

- a. Die Chl a/b Verhältnisse von T_2 (2,90) und B_2 (2,59) unterschieden sich signifikant, die Differenz war aber geringer als bei entsprechenden Vesikel-Fractionen aus unbehandelten Chloroplasten (siehe 4.5.)
- b. Der CF_0 -Gehalt von T_2 war mit 24 mm Rocket/3 μ g Chl nur um etwa 20 % höher als in der B_2 -Fraktion.
- c. Durch Rückbindung von CF_1 konnte in den T_2 -Vesikeln das in dem Ausgangsmaterial für die Präparation gefundene CF_1/CF_0 -Rocketverhältnis von 0,98 fast wiederhergestellt werden

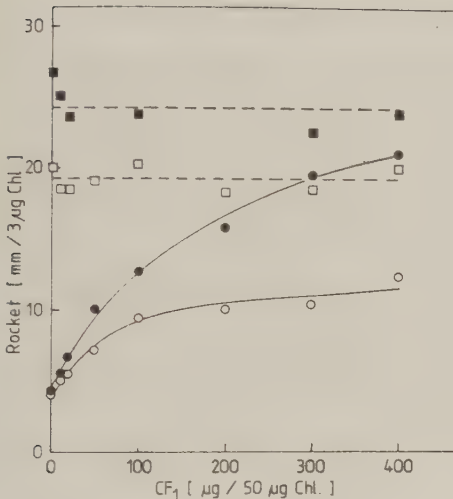


Abb. 44: Rückbindung von CF₁ an T₂- und B₂-Vesikel aus EDTA-behandelten Chloroplasten.

EDTA-behandelte Chloroplasten (VIII.5.) wurden in 10 mM Tricin-NaOH pH 7,4, 100 mM Saccharose resuspendiert und 1,5 h bei 4° C inkubiert. Durch Zugabe von HCl wurde der pH der Suspension dann auf 4,7 eingestellt (Aggregation der Membranen). Nach Yeda-Behandlung (2x) wurde der pH wieder auf pH 7,4 eingestellt. Alle weiteren Schritte der Vesikel-Faräparation wurden wie in VIII.18. beschrieben durchgeführt.

Die CF₁-Rückbindeansätze enthielten in 0,5 ml Volumen: T₂-bzw. B₂-Vesikel (50 µg Chl.), die angegebenen CF₁-Mengen (CF₁-Rohpräparat)¹ so-

wie die in Kap. VIII.19. aufgeführten Substanzen. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Ansätze mit je 12 ml 20 mM Tricin-NaOH pH 7,4, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ verdünnt und abzentrifugiert (Corex-Gläser, 20 min, 40000 xg, 4° C). Die Überstände wurden sehr sorgfältig entfernt (Filterpapier) und die Sedimente in 130 µl 3 % Triton X-100 gelöst. Je 6 µl dieser Lösungen wurden zur relativen CF₀- bzw. CF₁-Bestimmung durch EID eingesetzt. Die Chlorophyll-Konzentrationen der Ansätze wurden nachbestimmt. Rel. CF₁- bzw. CF₀-Gehalt der Kontroll-Chl: 31 bzw. 32 mm Rocket/3 µg Chl. Chl a/b: Kontroll-Chl. = 2,98, EDTA-beh. Chl: 2,95, B₂ = 2,59, T₂ = 2,90. EID: 20 µl AS 150-4 (anti-CF₁) bzw. 120 µl AS 169-4 A² (anti-CF₀) pro 10 ml Gel

□, ■ : CF₀; ○, ● : CF₁. Offene Symbole: B₂; geschlossene Symbole: T₂.

(0,87). Trotz sehr hohem CF₁-Überschuß war die Rückbindung nicht gesättigt (Da die Titrationskurve für die EDTA-behandelten Chloroplasten aber ganz identisch verlief - (nicht gezeigt) - muß wohl ein "schlechtes" CF₁-Präparat verwendet worden sein).

d. Durch CF₁-Rückbindung konnte in den B₂-Vesikeln maximal ein CF₁/CF₀-Rocketverhältnis von 0,58 erreicht werden.

Fast übereinstimmende Ergebnisse ließen sich erzielen, wenn in einem MgCl₂-haltigen Puffer wiedergestapelte (restacked) EDTA-behandelte Membranen als Ausgangsmaterial für die Vesikel-Prä-

paration verwendet wurden (Abb. 45).

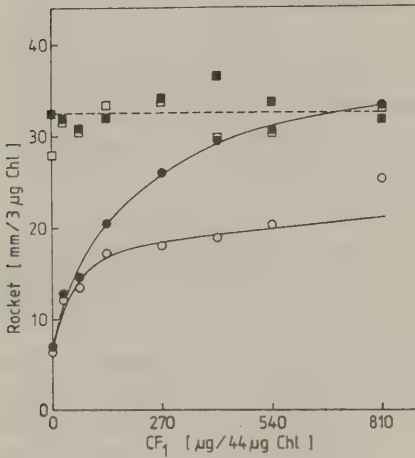


Abb. 45: Rückbindung von CF_1 an T_2 - und B_3 -Vesikel aus wiedergestapelten EDTA-behandelten Chloroplasten. EDTA-behandelte Chloroplasten (VIII.5.) wurden in 100 mM Saccharose, 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,4, 5 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ 1 h bei $4^\circ C$ inkubiert (Restacking). Die Yeda-Behandlung und die Isolierung der Vesikel erfolgte dann wie in VIII.18. beschrieben. Durchführung des CF_1 -Rückbindeversuches: wie in Abb. 44 beschrieben, mit je 44 µg Chl/Ansatz. Rel. CF_1 - bzw. CF_0 -Gehalt der Kontroll-Chl.: 38,7 bzw. 37,4 mm Rocket/3 µg Chl. Chl a/b: Kontroll-Chl. = 3,06, EDTA-beh. Chl. = 2,96, B_3 = 2,57, T_2 = 2,89. EID und Symbole wie in Abb. 44.

Die Ergebnisse der CF_1 -Rückbinde-Titrations zeigen klar, daß die erste Voraussetzung für die beabsichtigten Untersuchungen zur Erreichbarkeit des CF_0 von der Lumenseite her erfüllt werden konnte. Ein Teil der in B_3 enthaltenen CF_0 -Moleküle kann keinen CF_1 mehr zurückbinden und muß daher, da aufgrund der identischen Isolierungsbedingungen für B_3 und T_2 eine ausschließliche Schädigung der Bindestellen in der B_3 -Fraktion als Ursache ausgeschlossen werden kann, in i.o.-Vesikeln enthalten sein. Aus den Daten kann abgeschätzt werden, daß allerdings nur ein Drittel der CF_0 -Moleküle in i.o.-Vesikeln sitzt, der überwiegende Teil ist in kontaminierenden r.s.o.-Vesikeln enthalten. Vermutlich unterscheiden sich i.o.- und r.s.o.-Vesikel aus EDTA-behandelten Chloroplasten weniger stark in ihren Oberflächeneigenschaften als entsprechende Vesikel aus Kontroll-Chloroplasten und können deshalb durch Phasenverteilung weniger gut getrennt werden.

6.2. CF₀-Rocket-Verkürzungstest mit inside-out-Vesikeln

Mit welchem Antikörper-Bindungstest könnte nun eine Reaktion von Antikörpern aus den mit EDTA-behandelten Chloroplasten vollständig absorbierten CF₀-Antisera nachgewiesen werden? Hier bietet sich zunächst einmal der sehr einfach und schnell durchzuführende Agglutinationstest (21) an. Agglutination von i.o.-Vesikeln durch die zugegebenen CF₀-Antisera (Typ A- und B-Antikörper-adsorbiert) würde eine Erreichbarkeit des CF₀ von der Thylakoidlumenseite her beweisen, wenn entsprechende Kontrollen mit r.s.o.-Vesikeln negativ verliefen. Mit einer fast identischen Strategie konnten ANDERSSON et al. (8) demonstrieren, daß der LHCF-Komplex die Thylakoidmembran durchspannt; ein mit entstapelten Thylakoidmembranen vorinkubiertes Antiserum gegen LHCF agglutinierte B₃-Vesikel sehr viel stärker als T₂-Vesikel.

Da aber die aus EDTA-behandelten Chloroplasten isolierten Vesikel-Fractionen - sowohl T₂ als auch B₃ - bereits recht stark aggregiert waren und darüber hinaus auch durch sehr geringe Mengen an IgG aus Kontrollserum noch stärker verklumpt wurden, konnten eindeutige Ergebnisse auf diesem Wege nicht erzielt werden.

Es wurde deshalb versucht, die Bindung von CF₀-Antikörpern an die Lumenseite des in i.o.-Vesikeln enthaltenen CF₀ mit Hilfe des "Rocket-Verkürzungstests" (5.2.) nachzuweisen. Vorinkubation von i.o.- und r.s.o.-Vesikeln mit einem Typ A- und Typ B-Antikörper-freien CF₀-Antiserum sollte, wenn es Antikörper gegen die Lumenseite des CF₀ enthielte und CF₀ tatsächlich erreichbar wäre, ausschließlich zu einer "Verkürzung" der CF₀-Rocket in der B₃-Vesikel-Fraction führen.

Da die Antisera durch die Absorption mit Chloroplasten stark verdünnt werden, für den Rocket-Verkürzungstest jedoch ein möglichst konzentriertes Serum eingesetzt werden sollte, wurde ein CF₁-CF₀-Antiserum folgendermaßen absorbiert und wieder konzentriert. 10 ml AS 169-2 (anti-CF₁-CF₀) - dieses Serum wurde für den Test ausgewählt, da es Antikörper gegen alle CF₀-Untereinheiten enthielt (Abb. 19) - wurden zur Entfernung von CF₁-

und Typ A- CF_0 -Antikörpern bzw. Typ B- CF_0 -Antikörpern mit Kontroll-Chloroplasten bzw. EDTA-behandelten Chloroplasten (je 80 mg Chl in 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) nacheinander absorbiert. Aus dem Überstand des zweiten Absorptionsschrittes wurde die IgG-Fraktion durch Ammoniumsulfat-Fällung bis 45 % Sättigung ausgefällt, in wenig 10 mM Tricin-NaOH pH 8, 150 mM NaCl gelöst und zur Entfernung des Ammoniumsulfats gegen diesen Puffer dialysiert. Das Volumen betrug nach der Dialyse 2,5 ml. CF_1 -Antikörper ließen sich durch Ouchterlony-Test nicht mehr nachweisen. Der CF_0 -Antikörpertiter verminderte sich durch die Absorption etwa um 90 %.

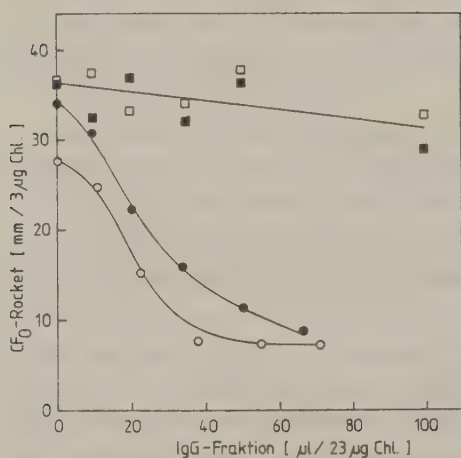


Abb. 46: CF_0 - "Rocket-Verkürzungstest" mit i.o.- und r.s.o.-Vesikeln. Für den Test wurden T_2 - und B_2 -Fraktionen nach der in Abb. 44 beschriebenen Methode isoliert. Chl a/b: T_2 = 3,00, B_2 = 2,81. Die Ansätze für den Rocketverkürzungstest mit Vesikeln enthielten in 0,5 ml: T_2 - bzw. B_2 -Vesikel (23 µg Chl), die angegebenen Mengen IgG-Fraktion (AS 169-2, absorbiert mit Kontroll- u. EDTA-beh. Chloroplasten (siehe Text) und die in Kap. VIII. 19. angegebenen Substanzen. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Ansätze mit 14 ml 100 mM Sucrose, 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,4,

5 mM NaCl verdünnt und abzentrifugiert (Corex-Gläser, 30 min, 40000 xg). Die Überstände wurden sorgfältig entfernt (Filterpapier und die Sedimente in 50 µl 3 % Triton X-100 gelöst. Je 6 µl dieser Lösungen wurden zur CF_0 -Bestimmung durch EID eingesetzt. Die Ansätze für den CF_0 -Rocketverkürzungstest mit den in 3 % Triton X-100 solubilisierten Vesikeln enthielten in 100 µl Volumen: T_2 - bzw. B_2 -Vesikel (23 µg Chl), 2,4 % Triton X-100 und die angegebenen Antiserummengen. Durch Zugabe von Kontroll-IgG wurden die unterschiedlichen Protein-Konzentrationen ausgeglichen. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden je 6 µl der Ansätze zur CF_0 -Rocketanalyse eingesetzt.

EID: 80 µl AS 169-4 A/10 ml Gel

■, ● : T_2 ; □, ○ : B_2 . Quadr. Symbole: Vesikel, runde Symbole: solubilisierete Vesikel

Der in Abb. 46 dargestellte "Rocket-Verkürzungstest" mit inside-out- und right-side-out-Vesikeln lieferte folgende Ergebnisse:

- a. Die CF_0 -Rocketlänge der in Triton X-100 solubilisierten T_2 - und B_3 -Vesikel war deutlich "verkürzt".
- b. Die CF_0 -Rocketlänge der T_2 - und B_3 -Vesikel nahm in beiden Fraktionen kaum ab.

Obwohl das Antiserum - wie a. zeigt - noch CF_0 -Antikörper enthielt, konnte mit dem angewandten Test keine Bindung von Antikörpern an den in den i.o.-Vesikeln enthaltenen CF_0 nachgewiesen werden.

Als Beweis für Nicht-Erreichbarkeit kann das Ergebnis nicht betrachtet werden, da nicht auszuschließen ist, daß das CF_0 -Antiserum keine Antikörper gegen ins Thylakoidlumen ragende Peptidanteile des CF_0 enthielt.

VI. DISKUSSION

Eine wesentliche Voraussetzung für das Verständnis der Funktion der ATP-Synthasen ist die Kenntnis der Struktur des vermutlich aus 8 verschiedenen Untereinheiten bestehenden Proteinkomplexes. Die Erforschung von Anzahl, Funktion und räumlicher Anordnung der Peptide des peripheren Teils CF_1 führte trotz vieler ungelöster Probleme bereits zu recht gut abgesicherten Modellvorstellungen (75). Entsprechende Untersuchungen am Membranteil des CF_1 - CF_0 -Komplexes sind weniger weit fortgeschritten, wohl auch deshalb, weil es bislang nicht gelungen ist, den CF_0 -Komplex bzw. alle seine Untereinheiten zu isolieren.

Durch die in dieser Arbeit vorgestellte immunologische Bestimmungsmethode für CF_0 könnte die Ausarbeitung einer Methode zur Isolierung von CF_0 aus isoliertem CF_1 - CF_0 oder aus CF_1 -verarmten Thylakoiden wesentlich erleichtert werden. Da die Rocketanalyse bei geringem Arbeitsaufwand relative Mengenbestimmungen in Membranfraktionen, Extrakten und detergenzextrahierten Komplexpräparaten ermöglicht, eignet sie sich vorzüglich zur Entwicklung und Optimierung einer Präparationsmethode. Neben der Spezifität und Reproduzierbarkeit (88) muß die hohe Empfindlichkeit der Methode hervorgehoben werden. Aus Abb. 24 kann man entnehmen, daß selbst dann noch mit in Triton X-100 solubilisierten Chloroplasten meßbare CF_0 -Rockets erhalten werden können, wenn die Chlorophyll-Konzentration 0,02 mg/ml beträgt (0,12 µg Chl/ 6 µl Probe). Die Empfindlichkeit läßt sich eventuell durch Verminderung der Antiserummenge im Agarose-Gel noch steigern. Da Chloroplasten etwa 0,5 mg CF_1 /mg Chl enthalten (88), das Molegewicht von CF_0 vermutlich weniger als 100000 beträgt (112) und gleich viel Mole CF_1 und CF_0 in der Thylakoidmembran vorliegen (4.5.), kann kalkuliert werden, daß eine CF_0 -Konzentration von ungefähr 3 µg/ml (0,02 µg CF_0 / 6 µl Probe) - völlig unabhängig vom Aktivitätszustand des Proteins - noch bestimmt werden kann. Weil homogener CF_0 für eine Eichung nicht zur Verfügung steht, sind bislang nur vergleichende Gehaltsbestimmungen möglich.

Unabdingbare Voraussetzung für die Durchführung der Rocketim-

munelektrophorese ist natürlich ein CF_0 -Antiserum hoher Spezifität. Wie man ein solches Antiserum erhalten kann, ohne den CF_0 -Teil der ATP-Synthase zu isolieren, wurde in Kap. III.3. beschrieben. Ob die CF_0 -Antiseren nicht nur analytisch, sondern auch präparativ eingesetzt werden können, muß die Zukunft zeigen. Durch Affinitätschromatographie mittels immobilisierter Antikörper könnten der CF_0 -Komplex vielleicht aus in Triton X-100 aufgelösten, möglichst CF_1 -freien Membranen gereinigt werden. Da für die Dissoziation von Antikörper-Antigen-Komplexen aber sehr drastische Bedingungen gewählt werden müssen, ist zumindest fraglich, ob der CF_0 so in aktiver Form isoliert werden kann. Immerhin würde sich ein solches Präparat für eine CF_0 -Untereinheitenpräparation sehr viel besser eignen als isolierter CF_1 - CF_0 -Komplex.

In den für die meisten CF_0 -Rocketanalysen verwandten AS 169-3(4)A konnten Antikörper vom Typ B (Abb. 36) nachgewiesen werden (Abb. 37). Diese Antikörper reagieren nur mit CF_0 und nicht mit CF_1 - CF_0 (membrangebunden). CF_0 und CF_1 - CF_0 -Komplex sind daher gegenüber AS 169-3(4)A nur partiell identisch. Daß CF_0 und CF_1 - CF_0 -Rockets dennoch direkt vergleichbar sind (Abb. 26), beruht sehr wahrscheinlich darauf, daß der CF_1 - CF_0 -Komplex bei der Elektrophorese - wie auch unter ganz ähnlichen Bedingungen beim Ouchterlony-Test (Abb. 11) - in CF_1 und CF_0 dissoziiert. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Befund, daß mit in Triton X-100 aufgelösten Kontroll-Chloroplasten in einem Agarose-Gel, das ein Gemisch aus CF_1 - und CF_0 -AS enthielt, zwei Rockets gebildet wurden (nicht gezeigt). Welche Faktoren für die Dissoziation von CF_1 - CF_0 , die auch bei der CF_1 - CF_0 -Präparation (Tab. III) und den Immunpräzipitationsversuchen (Abb. 26) beobachtet werden konnte, verantwortlich sind, konnte nicht geklärt werden.

Nach Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation eines CF_1 - CF_0 -Rohpräparates wiesen die verschiedenen Fraktionen stark differierende CF_0 : CF_1 -Verhältnisse auf (Abb. 29). Dieser Befund klärt, warum die Verteilung der ^{32}P -ATP-Austausch-Aktivität in dem untersuchten Sucrose-Gradienten nicht mit der CF_1 -Verteilung übereinstimmte (Abb. 7). Da die unteren Fraktionen des Sucrose-Gradienten auf CF_1 bezogen mehr CF_0 enthalten als die oberen, ist natürlich auch die für intakten CF_1 - CF_0 -Komplex charakteristi-

sche Austausch-Aktivität in den unteren Fraktionen wesentlich höher.

Untersuchungen von SÜSS & SCHMIDT (112) zur Untereinheitenstöchiometrie des CF_1 - CF_0 aus *Vicia faba* und *Avena sativa* ergaben, daß die CF_0 -Untereinheiten I und II in mit Hilfe von CF_1 -Antikörpern aus in Triton X-100 solubilisierten Chloroplasten präzipitiertem CF_1 - CF_0 -Komplex in nicht-stöchiometrischen Mengen vorliegen. Das Auftreten einer Stöchiometrie von $I_{0,3-0,4}$: $II_{0,7-0,9}$: $III_{4,6-4,8}$ pro CF_1 läßt sich allerdings nicht allein durch eine unvollständige Präzipitation des CF_0 -Teils der ATP-Synthase, wie sie in dem in Abb. 26 vorgestellten Experiment beobachtet wurde, erklären. Nur wenn man annähme, daß bei 100 %iger Präzipitation des CF_1 lediglich 30-40 % der CF_0 -Komplexe mitpräzipitiert worden wären, könnte aus den von SÜSS & SCHMIDT (112) bestimmten Werten eine ganzzahlige CF_0 -Untereinheiten-Stöchiometrie von I_1 : II_2 : III_{12-15} errechnet werden. Kontroll-Experimente ergaben aber (112), daß pro CF_1 - CF_0 -Komplex nicht mehr als eine II-Untereinheit enthalten sein kann. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, daß nicht mehr als 4-6 III je CF_1 - CF_0 -Komplex vorkommen, so daß die obige Annahme wohl kaum zutreffen kann. Für eine neben der Dissoziation von CF_1 - CF_0 in CF_1 und CF_0 auftretende Dissoziation von Untereinheit I aus dem in Triton X-100 gelösten Komplex - eine Möglichkeit, die das überproportionale "Fehlen" von I in Immunpräzipitat erklären könnte - gibt es keine Hinweise. In diesem Zusammenhang muß aber auf eine Arbeit von SEBALD et al. (94) verwiesen werden, in der gezeigt wurde, daß bei hohen Triton X-100-Konzentrationen ein Teil der in situ vollständig mit dem F_1 aus *Neurospora crassa* assoziierten Proteolipid-Untereinheiten selektiv abdissoziiert.

Ob die hohe Triton X-100-Konzentration für die Dissoziation von CF_1 - CF_0 in CF_1 und CF_0 (Abb. 26) verantwortlich gemacht werden kann, ist zweifelhaft, da die Rückbindung von CF_1 an CF_0 auch durch eine hohe Triton X-100-Konzentration nicht gehemmt wurde (Abb. 27). Inkubiert man EDTA-behandelte Membranen mit einer zur Besetzung der freien Bindungsstellen theoretisch ausreichenden Menge an CF_1 , so werden etwa 80 % der freien Bin-

dungsstellen (CF_0) von CF_1 besetzt (88), während in Gegenwart von 2,5 % Triton X-100 bei einem entsprechenden CF_0/CF_1 -Verhältnis noch etwa 60 % der CF_0 wieder an einen CF_1 banden (Abb. 27). Offenbar bindet Triton X-100 nicht an die für die Bindung von CF_1 essentiellen Strukturen des CF_0 . Spekulationen über die Beteiligung von hydrophoben Interaktionen an der CF_1 - CF_0 -Bindung (88) werden durch diese Befunde zumindest in Frage gestellt.

Mit Hilfe der ausgearbeiteten quantitativen immunologischen Bestimmungsmethode für CF_0 konnte durch Analyse von aus exponierten und nichtexponierten (24) Bereichen des Lamellarsystems stammenden Vesikelfractionen eine heterogene Verteilung des CF_0 abgesichert werden (Tab. V). CF_0 ist ebenso wie CF_1 (24) in den exponierten Bereichen des Thylakoidmembransystems stark angereichert; CF_1 - und CF_0 -Verteilung, so konnte durch Paralleluntersuchungen festgestellt werden, stimmen erwartungsgemäß überein (Tab. V). BERZBORN et al. (24) fanden mit derselben Methodik, daß in der 100 K-Fraktion auf Chl bezogen 10 mal soviel CF_1 vorhanden war als in der i.o.-Fraktion (B_3). Ein derart extremer Unterschied konnte von mir in mehreren Präparaten nicht bestätigt werden; wahrscheinlich enthielten die von mir isolierten B_3 -Fraktionen einen relativ hohen Anteil an kontaminierenden r.s.o.-Vesikeln. Nach Abschätzungen von ANDERSSON & AKERLUND (5) enthalten selbst gut präparierte B_3 -Fraktionen nur 75 % i.o.-Vesikel. In der Tat lieferte der "Rocketverkürzungstest" (4.2.) Hinweise dafür, daß der in der B_3 -Fraktion enthaltene CF_1 für CF_1 -Antikörper zugänglich ist (nicht gezeigt), also aus r.s.o.-Vesikeln stammt. Partition-Membranen (i.o.), so muß aus diesen Daten gefolgert werden, enthalten keinen CF_1 - CF_0 -Komplex. Das Vorkommen von freiem CF_0 kann zwar nicht aufgrund der identischen CF_1 - und CF_0 -Verteilungen - CF_1 - CF_0 -Komplex- und CF_0 -Verteilung könnten ja gleich sein -, wohl aber aufgrund der vollständigen Präzipitierbarkeit des CF_0 -Komplexes aus in Triton X-100 solubilisierten Thylakoidmembranen durch CF_1 -Antikörper (4.3.) ausgeschlossen werden.

Auf eine Konsequenz der räumlichen Trennung von PS II-Wasserspaltung (nicht exponierte Bereiche) und CF_1 - CF_0 (exponierte Bereiche) machten BERZBORN et al. (24) aufmerksam: Die bei der

H₂O-Spaltung freigesetzten Protonen müssen relativ große Entfernungen zu den H⁺-konsumierenden CF₁-CF₀-Komplexen in den exponierten Bereichen des Lamellarsystems zurücklegen. Die Ansicht, daß dieser "laterale" H⁺-Transport in Übereinstimmung mit der chemiosmotischen Hypothese von MITCHELL (71,72) über das als H⁺-pool fungierende Thylakoidlumen erfolgt, wird allerdings nicht uneingeschränkt akzeptiert. Befunde von TANDY et al. (113), die eine Interaktion von nicht durch das Thylakoidlumen fließenden Protonen (die PS II-Spezifität des Effektes wurde später dementiert; DILLEY, R.A., Vortrag in Bochum 1983) mit einem Teil (25 %) der Proteolipid-Untereinheiten der CF₁-CF₀-Komplexe belegen, wurden als Hinweis für das Vorkommen von intramembranen H⁺-Flüssen in Domänen, wie sie von WILLIAMS (117) aus energetischen Gründen gefordert wurden, gewertet. Die Stimulierung der PSP in EDTA-behandelten Chloroplasten durch CF₀-Antikörper vom Typ B (Abb. 42) und die prozentual niedrigere Hemmung der PSP durch AS 187-A unter nicht CF₁-limitierten Phosphorylierungsraten (5.6.) zeigen aber, daß die den durch Antikörper "verschlossenen" CF₀-Molekülen "zugedachten" H⁺ von den nicht gehemmten ATP-Synthasen zur ATP-Bildung verwertet werden können. Eine enge Assoziation von H⁺-produzierenden Elektronentransportkomponenten und ATP-Synthasen - von HITCHENS & KELL (51) für den photosynthetischen Apparat von Rhodospseudomonas capsulata gefordert - kann aufgrund dieser Ergebnisse wohl ausgeschlossen werden.

Die Hemmung der Rückbindung von CF₁ an EDTA-behandelte Membranen durch die CF₀-Komplex-Antiseren (Abb. 30) zeigt, daß der CF₀ nach Ablösung des CF₁ für Antikörper zugänglich ist und daß die hergestellten Antiseren Antikörper gegen die zum Stroma gerichtete Fläche des CF₀ enthalten. Obwohl die Seren die Assoziation von CF₁ und CF₀ hemmen, verdrängten die hochaffinen Antikörper den CF₁ in Kontroll-Chloroplasten nicht von der Thylakoidmembran (Abb. 31). Das Gleichgewicht der Bindung zwischen CF₁ und CF₀ liegt also in der Membran weit auf Seiten des assoziierten Komplexes. Da dennoch die Bindung von CF₀-Antikörpern an den membrangebundenen CF₁-CF₀-Komplex nachgewiesen werden konnte (Abb. 31), kann die Stromaseite des CF₀ nicht vollständig vom

CF_1 überdeckt sein. Die an dieser nicht mit CF_1 in Kontakt stehenden Fläche bindenden CF_0 -Antikörper (Typ A) hemmten den H^+ -efflux durch CF_0 , wie aus der Stimulierung des extents der H^+ -Aufnahme in EDTA-behandelten Chloroplasten (Abb. 39, 40) bzw. der Verlangsamung des Zusammenbruchs des pH-Gradienten nach Abschalten des Lichts (Abb. 41) geschlossen wurde. Diese Befunde schließen Entkopplung oder Inhibition des Elektronentransports als Ursache für die Hemmung der PSP (Abb. 32, A,B) durch die CF_0 -Antiseren aus. Ein nicht näher charakterisiertes Antiserum gegen TF_0 -Komplex hemmte ebenfalls CF_1 -Rückbindung an bzw. die H^+ -Leitfähigkeit von in Liposomen rekonstituiertem TF_0 -Komplex (83). Das AS 187-A, in dem durch Immunoblotting nur CF_0 -Antikörper gegen Untereinheit II nachgewiesen werden konnten (Abb. 19), erwies sich als ein besonders potenter Inhibitor der PSP (Abb. 32 A). Diese Ergebnisse können als ein Hinweis dafür aufgefaßt werden, daß den in Kontroll-Chloroplasten exponierten Anteilen des CF_0 -Komplexes, insbesondere der Untereinheit II, eine wichtige Funktion bei der H^+ -Translokation bzw. Energietransformation zukommt. Anhaltspunkte dafür, daß neben der Proteolipid-Untereinheit, deren Funktion bei der H^+ -Translokation als abgesichert gelten muß, weitere Untereinheiten des Membranteils der ATP-Synthase am H^+ -Transfer beteiligt sind, konnten bei E. coli ebenfalls gefunden werden. Eine Mutante, der Untereinheit b fehlte, wies trotz "normalen" Proteolipids (c) verminderte H^+ -Translokationsaktivität auf (41); der F_0 aus a-defizienten Mutanten war praktisch inaktiv (40). Als Beweis für eine direkte Beteiligung dieser Peptide am H^+ -Transfer können diese Befunde aber nicht betrachtet werden, da a und b möglicherweise eine indirekte strukturelle Rolle beim Zusammenbau des F_0 zu einem aktiven Komplex spielen. Nach einem allerdings nicht experimentell abgesicherten Vorschlag von NELSON et al. (81) soll CF_0 -Untereinheit II eine solche Funktion als Organisator beim "assembly" des CF_0 innehaben.

Eine H^+ -Transfer-Funktion der mit CF_1 gar nicht in Kontakt stehenden CF_0 -Fläche an einem in den CF_1 hineinführenden H^+ -Kanal - nach dem von MITCHELL (72) vorgeschlagenen Mechanismus für die ATP-Bildung werden die "energiereichen" Protonen am kata-

lytischen Zentrum des CF_1 benötigt - muß aber wohl aus strukturellen Gründen ausgeschlossen werden; über diese Flächen fließende Protonen würden ihre Energie verlieren, bevor sie das aktive Zentrum des CF_1 erreichen könnten. Wie ist aber dann die Hemmwirkung der CF_0 -Antikörper vom Typ A zu erklären? Eine nicht ohne weiteres auszuschließende Möglichkeit ist, daß die in Kontroll-Chloroplasten an CF_0 bindenden Antikörper (Typ A) einen allosterischen Einfluß auf die Proteolipid-Untereinheiten bzw. auf die mit CF_1 in Kontakt stehenden Teile der Untereinheiten I und II ausüben. Die Hemmung der ATP-Bildung durch die CF_0 -Antikörper (Abb. 32 A,B) müßte dann als eine Folge des unterbrochenen H^+ -fluxes durch den H^+ -Kanal angesehen werden.

Schließt man die Möglichkeit eines allosterischen Effekts einmal aus, so könnte die Hemmung der ATP-Bildung durch die Typ A-Antikörper vielleicht dadurch erklärt werden, daß sie für die Funktion des CF_0 notwendige Konformationsänderungen, in die die exponierten Bereiche des CF_0 einbezogen sein müßten, verhindern, den CF_0 also in einer - so muß wegen des gehemmten H^+ -effluxes angenommen werden - H^+ -dichten Konformation fixieren. Die gefundenen Effekte könnten also als ein Hinweis darauf gedeutet werden, daß der CF_0 -Teil der ATP-Synthase bzw. Untereinheit II Konformationsänderungen durchführt. Eine durch H^+ -Translokation nicht im CF_1 , sondern im CF_0 selbst erzeugte energiereiche Konformation (28), die erst in einem zweiten Schritt auf den Kopplungsfaktor übertragen wird, könnte nach einem Vorschlag von SEBALD & HOPPE (95) der erste Schritt der Energietransformation in den ATP-Synthasen sein.

Die an die Bindungsfläche bzw. nahe an die Bindungsfläche grenzende Bereiche des CF_0 bindenden CF_0 -Antikörper (Typ B) hemmen, so wurde aus der Stimulierung der PSP in EDTA-behandelten Chloroplasten (Abb. 42 A,B) geschlossen, ebenso wie Typ A-Antikörper den H^+ -efflux durch CF_0 . Eine Beteiligung der mit CF_1 in engen Kontakt stehenden CF_0 -Untereinheiten oder Teile von Untereinheiten - Untereinheit II muß aufgrund der in Abb. 42 A gezeigten Ergebnissen zu diesen gerechnet werden - an einem H^+ -Kanal ist durchaus vorstellbar. Hemmwirkung durch allosterische

Einflüsse oder durch Verhinderung von Konformationsänderungen kann allerdings auch hier nicht völlig ausgeschlossen werden. Insgesamt ähneln die von den CF_0 -Antisera ausgeübten Effekte stark denen des Energietransferinhibitors DCCD, der wie die CF_0 -Antikörper "extant" der H^+ -Aufnahme und PSP mit EDTA-behandelten Chloroplasten stimuliert und die PSP mit Kontroll-Chloroplasten hemmt (68). Im Gegensatz zu den an der hydrophilen Oberfläche des CF_0 reagierenden Antikörpern bindet DCCD jedoch kovalent an eine vermutlich in der Membran verborgene Aminosäure (Glu) des DCCD-Bindungsproteins (96).

Bereits aus den Inhibitionsexperimenten mit AS 187-A (anti- CF_0 -II) war geschlossen worden (5.7.), daß Teile von Untereinheit II sowohl in dem in Kontroll-Chloroplasten exponierten als auch in dem nichtexponierten Bereich der CF_0 -Stromaseite lokalisiert sind. Durch vergleichende Immunoblotting-Analyse von nichtabsorbierten bzw. mit Kontroll- oder EDTA-behandelten Chloroplasten absorbierten CF_0 -Antisera (Abb. 43) konnten diese Schlüsse abgesichert werden. Teile von Untereinheit I sind ebenfalls in Kontroll-Chloroplasten für Antikörper zugänglich bzw. werden nach Ablösung des CF_1 erreichbar (5.7.). Diese strukturellen Daten lassen eine Beteiligung von I und II an der CF_1 -Bindung - von NELSON et al. (81) in einem bestehenden Modell bereits für I vorgeschlagen - als wahrscheinlich erscheinen. Ob möglicherweise nur eine der beiden Untereinheiten für die Bindung essentiell ist, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden. Beim thermophilen Bakterium PS3 konnte nachgewiesen werden, daß nur eine TF_0 -Untereinheit für die Bindung des TF_1 notwendig ist (106). Interessanterweise ist an die Cytoplasmamembran einer α ($\times$)-defizienten Mutante von E. coli noch EF_1 gebunden, allerdings weniger "fest" als im Wildtyp (40). Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, daß sowohl α als auch β an der Bindung von EF_1 beteiligt sind. Untersuchungen von ENNS & CRIDDLE (35) an F_1 - F_0 aus Mitochondrien legen die Vermutung nahe, daß die größte Untereinheit des F_0 das Bindeglied zwischen F_1 und F_0 ist; nur $F_0(1)$ konnte mit F_1 -Untereinheiten chemisch kreuzvernetzt werden. Funktionelle Unterschiede der gleichbezeichneten F_0 -Untereinheiten aus

verschiedenen Spezies erscheinen aufgrund dieser uneinheitlichen Befunde durchaus möglich.

Der bei den Proteolipiden verschiedener Spezies bemerkenswert einheitliche, polare Abschnitt der Aminosäuresequenz könnte nach einem Vorschlag von SEBALD & HOPPE (95) in Kontakt mit CF_1 -Untereinheiten stehen und an der H^+ -Translokation beteiligt sein. Mit Hilfe des Antiserums gegen die isolierte Proteolipid-Untereinheit konnten hierfür keine Hinweise gefunden werden (5.4.). Proteolipid-Antikörper aus dem CF_0 -Komplex-Antiserum 169-3 A konnten mit Kontroll-Chloroplasten absorbiert werden (Abb. 43), ein noch wenig abgesichertes (5.7.) Ergebnis, das Kontakt zwischen CF_1 und III zwar nicht ausschließen kann, aber auch nicht wahrscheinlich erscheinen läßt. DECKER et al. (33) gelang es nicht, Zugänglichkeit des membrangebundenen Proteolipids (c) aus *E. coli* für hydrophile Agentien nachzuweisen. Nach Assoziation mit *E. coli*-Membranen war das in vitro translatierte (chymotrypsin-sensitive) Peptid durch die Protease absolut nicht mehr verdaubar. Untereinheit a wurde nach Assoziation mit der Membran weniger gut verdaubar, während b in Lösung und membrangebunden fast gleich stark von der Protease angegriffen wurde (33). Der aus diesen Ergebnissen abgeleitete Schluß, daß die Peptidkette von c fast vollständig, die von a zu einem großen Teil und die von b nur zu einem geringen Anteil in der Membran verborgen ist, wird durch die Aminosäure-Analysen der Peptide unterstützt. Während c einen extrem hohen Anteil an unpolaren Aminosäuren aufweist (96), hat b eher hydrophilen Charakter; a nimmt eine Zwischenstellung ein (107). Die Klärung der Frage, ob CF_0 -I und II vergleichbare Eigenschaften aufweisen, wird Aminosäuren- bzw. DNA-Basensequenzanalysen vorbehalten bleiben müssen. Aus der relativ starken Abnahme des CF_0 -Präzipitationstiters (6.2.) bzw. II- und I-Antikörper-Titers (Abb. 43) durch Absorption mit CF_0 -Stromaseite mag zwar der Eindruck entstehen, daß relativ große Anteile des CF_0 bzw. der Untereinheiten I und II nicht in der Membran verborgen sind; Abschätzungen über den jeweils exponierten Anteil der Peptide können aber aufgrund der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse nicht vorgenommen werden, da nicht ohne weiteres davon

ausgegangen werden kann, daß von den Kaninchen gegen alle Teilstücke der Peptide gleich viel Antikörper produziert worden sind. Zugänglichkeit des CF_0 -Komplexes für Antikörper von der Lumenseite der Thylakoidmembran her konnte nicht bewiesen werden (6.2.), obwohl der Befund, daß in Liposomen rekonstituierter CF_1 - CF_0 -Komplex einen durch Säure-Basen-Sprung induzierten transmembranen H^+ -Gradienten zur ATP-Synthase nutzen kann (86), dafür spricht, daß Peptide des CF_0 in direktem Kontakt zum Thylakoidlumen stehen. Die aus der Aminosäuresequenz abgeleitete Sekundärstruktur des Proteolipids läßt ebenfalls eine transmembrane Orientierung des Proteolipids wahrscheinlich erscheinen (95); allerdings ragen nur wenige Aminosäuren aus der Membran heraus. Auch aufgrund des aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen abgeschätzten Durchmessers des CF_0 -Komplexes von etwa 95 Å (73) muß wohl angenommen werden, daß er die ca. 70 Å dicke Thylakoidmembran durchspannt. Aus der reduzierten CF_1 -Rückbindefähigkeit der CF_1 -enthaltenden i.o.-Vesikel kann geschlossen werden, daß der CF_0 , falls er tatsächlich ein transmembraner Komplex sein sollte, bezüglich der Membranebene asymmetrisch aufgebaut sein muß.

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zur strukturellen Organisation des CF_0 -Komplexes sind in dem in Abb. 47 dargestellten Modell zusammengefaßt.

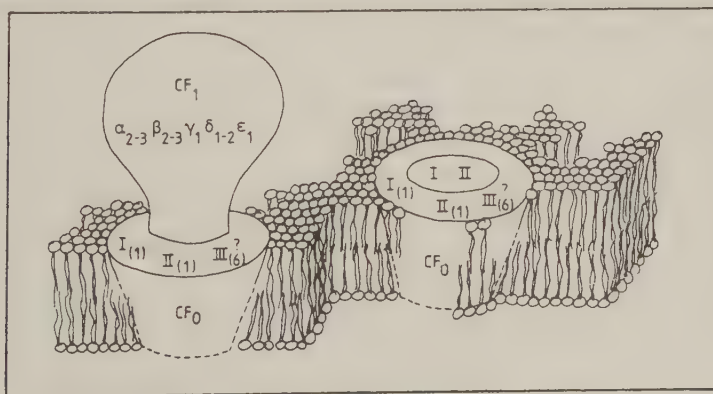


Abb. 47: Schematische Darstellung des CF_1 - CF_0 -Komplexes der Thylakoidmembran.

Nach einem Modell von BARBER & CHOW (17) enthalten gestapelte Membranbereiche des Lamellarsystems Proteine mit relativ niedriger, nichtgestapelte Bereiche solche mit relativ hoher Oberflächenladungsdichte. CF_1 - CF_0 -Komplex, der sich nur in den exponierten Flächen des Thylakoidmembransystems, den Stromalamellen und den Grana-Endmembranen befindet (19, 24, 70), müßte demnach zu den hochgeladenen, elektrostatische Abstoßung bewirkenden Proteinkomplexen zählen. CF_0 allein kann sich aber in gestapelten Membranbereichen aufhalten, da nur aus eng aneinanderliegenden Membranabschnitten entstehende i.o. Vesikel (11) aus EDTA-behandelten Chloroplasten CF_0 enthielten (6.1.). Membrangebundener CF_0 -Komplex sollte daher eine niedrigere Oberflächenladungsdichte als CF_1 - CF_0 aufweisen. Ein Hinweis, daß dies in der Tat der Fall sein könnte, ist in der geringeren elektrophoretischen Beweglichkeit des CF_0 , verglichen mit CF_1 - CF_0 , in der Immunelektrophorese zu sehen (nicht gezeigt), wenngleich sichere Rückschlüsse auf die Ladungsdichten der jeweils exponierten Oberflächen von membrangebundenen CF_0 bzw. CF_1 - CF_0 aufgrund dieses Ergebnisses nicht möglich sind.

Kurz vor Abschluß des experimentellen Teils dieser Arbeit erschien eine Publikation (111), in der Hinweise dafür präsentiert wurden, daß die als CF_0 -Untereinheiten I und II bezeichneten Peptide proteolytisch veränderte LHCP-Peptide sind, die während der Isolierung des CF_1 - CF_0 -Komplexes durch Immunpräzipitation mit Hilfe von CF_1 -Antikörpern an den nur aus 4-6 Proteolipid-Untereinheiten bestehenden CF_0 -Komplex binden. SÜSS & MANTEUFFEL (111) produzierten Antiseren gegen die aus SDS-Gelen "ausgeschnittenen" Untereinheiten I (20 kd) und II (17 kd) des aus Triton X-100-Extrakten immunpräzipitierten CF_1 - CF_0 -Komplexes und fanden, daß I- bzw. II-Antikörper in der Immunoblotting-Analyse mit einem 26 kd- bzw. 24,5 kd-Peptid von in Gegenwart von Protease-Inhibitoren isolierten Thylakoiden reagieren. Zumindest das 26 kd-Protein konnte eindeutig als die Hauptkomponente des LHCP-Komplexes identifiziert werden. Als merkwürdig bezeichnet werden muß allerdings, daß in der 20 kd- bzw. 17 kd-Region absolut keine Reaktion auftrat, obwohl - wie in der Diskussion der Veröffentlichung erwähnt - Immunpräzipitate aus offenbar in Ge-

genwart von Proteaseinhibitoren isolierten und solubilisierten Thylakoidmembranen noch "gewisse" Mengen an I und II enthielten. Da eine Serumprotease für das Entstehen der Peptide nicht verantwortlich gemacht werden kann - detergentextrahierter CF_1 - CF_0 -Komplex enthält diese Peptide ja auch (86, Kap. 1.3. dieser Arbeit) - müßten diese Peptide auch in isolierten Thylakoiden vorhanden gewesen sein; folglich müßten I- und II-Antikörper auch in der 20- bzw. 17 kd-Region reagiert haben. Interessanterweise reagierte das von mir hergestellte CF_0 -Antiserum 187-A, das Antikörper gegen II enthielt, nicht mit einem 24,5 kd-Protein (Abb. 19); das I-Antikörper-enthaltende CF_0 -AS 169-3 A reagierte zwar auch in der LHCP-Region (3.3.2.), da das für die Immunisierung benutzte CF_1 - CF_0 -Präparat aber Spuren an LHCP enthalten hätte, die das Kaninchen möglicherweise zur Bildung von LHCP-Antikörpern stimuliert haben könnten, kann nicht entschieden werden, ob es sich um eine Kreuzreaktion handelte. Von N. NELSON produzierte Antiseren gegen I und II kreuzreagierten nicht mit einem 26 kd- bzw. 24,5 kd-Peptid der Thylakoidmembran (Dr. P. WESTHOFF, persönliche Mitteilung), was natürlich mögliche Kreuzreaktionen anderer Seren nicht ausschließt.

Das für Untereinheit I codierende Gen konnte im Plastiden-Chromosom (Plastom) lokalisiert und sogar kartiert werden - in Spinat übrigens in enger Nachbarschaft zu dem für III codierenden Gen. Dagegen ist das Hauptprotein des LHCP-Komplexes im Zellkern kodiert (116). Die Vorstellung, daß I ein Abbauprodukt des 26 kd-LHCP-Peptids ist, kann mit diesem Ergebnis wohl nicht in Einklang gebracht werden. Untereinheit II ist Kern-codiert, das durch II-Antikörper präzipitierte in vitro-Translationsprodukt ist mit ca. 23 kd immer noch kleiner als das nach SÜSS & MANTEUFFEL (111) kreuzreagierende 24,5 kd-Protein (116). Es wird von intakten Chloroplasten aufgenommen und processiert (BARTLETT & WESTHOFF, unveröffentlicht, zitiert nach 116). Angesichts dieser Argumente müssen die von SÜSS & MANTEUFFEL (111) vorgestellten Ergebnisse als unerklärlich und dringend einer Überprüfung bedürftig bezeichnet werden. Die allgemein akzeptierte Auffassung, daß ein funktioneller CF_0 aus mehreren verschiedenen Untereinheiten besteht, kann durch diese Veröffentlichung wohl nicht er-

schüttet werden. Die Möglichkeit, daß I und II Abbauprodukte des LHCP-Komplexes sind, kann letztlich nur durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen von I und 26 kd-Protein bzw. II und 24,5 kd-Protein ausgeschlossen werden. Da die für I und 26 kd-LHCP codierenden Gene bereits kloniert werden konnten (116), ist die Aufklärung der Basen- und damit der Aminosäuresequenz sicherlich schon in naher Zukunft zu erwarten. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse können die Authentizität der als CF_0 -Untereinheiten I und II bezeichneten Peptide zwar nicht absolut zwingend beweisen, sind aber nur durch recht unwahrscheinlich erscheinende Annahmen mit den von SÜSS & MANTEUFFEL (111) vertretenen Vorstellungen in Übereinstimmung zu bringen. Um z.B. die 100 %ige Hemmung der PSP durch AS 187-A, in dem nur CF_0 -Antikörper gegen II nachgewiesen werden konnten (Abb. 19), erklären zu können, müßte angenommen werden, daß bereits in der Membran an jeden CF_0 -Komplex ein Bruchstück des 24,5 kd-Proteins gebunden hat (nach SÜSS & MANTEUFFEL enthalten nur 70-90 % der immunpräzipitierten CF_1 - CF_0 -Komplexe "Untereinheit II") und daß der an das nicht-funktionelle Peptid bindende Antikörper aufgrund allosterischer Effekte hemmt.

Die Unsicherheit über die Untereinheitenzusammensetzung und auch die Unvollständigkeit des in Abb. 47 gezeigten Modells machen deutlich, daß man von einer genauen Kenntnis der Struktur des CF_0 -Komplexes noch weit entfernt ist. Die schnelle Entwicklung der letzten Jahre berechtigt aber wohl zu der Hoffnung, daß bereits in absehbarer Zukunft Fortschritte erzielt werden können, die zu einem besseren Verständnis von Struktur und Funktion der ATP-Synthase-Komplexe beitragen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Methode zur Isolierung des CF_1 - CF_0 -Komplexes vorgestellt (Kap. 1.3.). Die Untereinheitenzusammensetzung des durch Triton X-100-Extraktion, Anionenaustauscher-Chromatographie und Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigten Protein-Komplexes glich der von mit Hilfe von CF_1 -Antikörpern aus Triton X-100-Extrakten immunpräzipitiertem bzw. der von Cholat/Octylglucosid extrahiertem CF_1 - CF_0 -Komplex (Abb. 6). Der isolierte ATP-Synthase-Komplex wies nach Rekonstitution in Liposomen noch ^{32}P -ATP-Austausch-Aktivität auf (Kap. 1.4.).

Durch Injektion von isoliertem (Kap. 3.1.) und immunpräzipitiertem (Kap. 3.2.) CF_1 - CF_0 -Komplex bzw. mittels organischer Lösungsmittel aus Thylakoidmembranen extrahierter (Kap. 2.1.) Proteolipid-Untereinheit (Kap. 3.4.) in Kaninchen konnten Antiseren guter Spezifität erzeugt werden. Aus den CF_1 - CF_0 -Antiseren wurden durch Absorption mit isoliertem CF_1 monospezifische CF_0 -Komplex-Antiseren hergestellt (Kap. 3.3.).

Für die quantitative Bestimmung von CF_0 wurde eine neue immunchemische Methode ausgearbeitet (Kap. 4.1. u. 4.2.). Obwohl membrangebundener CF_0 und CF_1 - CF_0 -Komplex gegenüber dem für die CF_0 -Rocketanalysen verwandten CF_0 -Antiserum nur partiell identisch waren (Typ B-Antikörper reagieren nur mit CF_0 ; siehe Kap. VI.), konnten CF_0 - und " CF_0 - CF_1 "-Rockets direkt miteinander verglichen werden (Kap. 4.3.), da CF_1 - CF_0 -Komplex bei der EID wahrscheinlich dissoziiert.

Die Untersuchung des CF_0 / CF_1 -Verhältnisses in den verschiedenen Fraktionen der CF_1 - CF_0 -Präparation ergab, daß sich das CF_0 / CF_1 -Verhältnis bei der Reinigung vermindert, also relativ mehr CF_0 verlorengelht (Abb. 28, Tab. III). Die unterschiedlichen CF_1 -spezifischen ^{32}P -ATP-Austausch-Aktivitäten in den Fraktionen eines durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigten CF_1 - CF_0 -Präparates (Abb. 7) konnten durch die verschiedenen CF_0 / CF_1 -Verhältnisse der Fraktionen erklärt werden (Abb. 29).

CF_1 und CF_0 sind innerhalb des Lamellarsystems gleich heterogen

verteilt; CF_1 - CF_0 befindet sich nur in den exponierten Membranbereichen (Tab. V).

Antikörperbindungs-, Inhibitions- und Absorptionsversuche lieferten folgende Ergebnisse zur Funktion und strukturellen Organisation des CF_0 :

1. CF_0 -Antikörper banden an membrangebundenen CF_1 - CF_0 , ohne den CF_1 von der Membran zu verdrängen (Abb. 31). Ein Teil der Stromaseite des CF_0 ist also nicht von CF_1 überdeckt.
2. Antikörper gegen die CF_0 -Untereinheiten I, II und III konnten mit Kontroll-Chloroplasten absorbiert werden (Abb. 43). Teile dieser Untereinheiten sind somit in dem nicht von CF_1 überdeckten Bereich des CF_0 anwesend.
3. Durch Absorption mit EDTA-behandelten Chloroplasten wurde der Antikörpertiter gegen I und II stärker erniedrigt als mit Kontroll-Chloroplasten (Abb. 43). Teile der Untereinheiten I und II werden also erst nach Entfernung des CF_1 für Antikörper zugänglich. Aufgrund dieser strukturellen Daten erscheint eine Beteiligung von I und II an der CF_1 -Bindung wahrscheinlich.
4. Zugänglichkeit des CF_0 von der Thylakoidlumenseite her konnte nicht nachgewiesen werden (Kap. 6.2.). Sollte CF_0 ein transmembraner Komplex sein, so muß er bezüglich der Membranebene asymmetrisch aufgebaut sein, da in i.o.-Vesikeln enthaltener CF_0 keinen CF_1 bindet (Kap. 6.1.).
5. Die an die in Kontroll-Chloroplasten zugänglichen Strukturen des CF_0 bindenden Antikörper - insbesondere anti-II - hemmten die PSP (Abb. 32, 34-37) und - ebenso wie die in EDTA-behandelten Chloroplasten mit der CF_1 - CF_0 -Bindungsfläche reagierenden CF_0 -Antikörper (Abb. 42) - den H^+ -efflux durch CF_0 (Abb. 41). Aus diesen Ergebnissen kann man den Schluß ziehen, daß Untereinheit II eine essentielle Funktion bei der H^+ -Translokation bzw. der Energietransformation zukommt.

VIII. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Die benutzten Chemikalien (p.A.) wurden von der Fa. MERCK bezogen, außer: PMS, RSA, SERVA Blau G 250, Acrylamid, Triton X-100 (speziell gereinigt für die Szintillationstechnik), Polyäthylenglykol 4000, Amidoschwarz und Na-desoxycholat von SERVA; Octylglucosid, Phenylmethylsulfonylflourid, DTT, Trypsin (Typ XI, DPCK-behandelt), L- α -Phosphatidyl-Cholin (Soja-Bohne, Typ II-s) und Agarose von SIGMA; DEAE-Sephacryl CL-6B, Sephadex S-300 und Dextran T 500 von PHARMACIA; ATP und ADP von BOEHRINGER; N,N-Methylenbisacrylamid und Ammoniumheptamolybdat von FLUKA; ^{125}J -Protein A (2-10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) von NEW ENGLAND NUCLEAR; Nitrocellulose (0,45 μm) von BIO-RAD.

2. Pflanzenmaterial

Spinat (*Spinacia oleracea* L.) wurde in Klimakammern unter Kurztagbedingungen (13 h Licht/11 h Dunkel) bei ca. 10000 lux und einer Temperatur von 15-17° C angezogen oder vom lokalen Markt bezogen.

3. Isolierung von Chloroplasten-Lamellarsystemen aus Spinat

Ca. 30 g Spinatblätter werden in etwa 80 ml STN (400 mM Saccharose, 20 mM Tricin-NaOH pH 7,8, 10 mM NaCl) im Braun-Mixer bei Stufe III ca. 10 sec lang zerkleinert. Nach Filtration durch 4 Lagen Gaze zentrifugiert man 10 min bei 3000 xg (4° C), der Überstand wird verworfen und das Sediment in 40 ml 10 mM NaCl resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 17000 xg (10 min) wird das Sediment - wenn nicht anders angegeben - in wenig 10 mM NaCl resuspendiert und als Chloroplasten-Stammlösung verwendet.

4. Chlorophyllbestimmung (nach ARNON, 13)

Zu 80 μl der Chloroplasten-Suspension werden 10 ml 80 %iges Aceton pipettiert, kräftig geschüttelt und 5 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Im Photometer werden die OD₇₄₀, OD₆₆₃, OD₆₄₅ des klaren Überstandes gegen 80 %iges Aceton bestimmt. Die Chlorophyll a- und b-Konzentrationen

werden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$[12,7 \times (OD_{663} - OD_{740}) - 2,69 \times (OD_{645} - OD_{740})] \times 125 = c_a$$

$$[22,9 \times (OD_{645} - OD_{740}) - 4,68 \times (OD_{663} - OD_{740})] \times 125 = c_b$$

$$[20,2 \times (OD_{645} - OD_{740}) + 8,02 \times (OD_{663} - OD_{740})] \times 125 = c_a + c_b$$

c_a , c_b in $\mu\text{g/ml}$ Suspension

5. EDTA-Behandlung

Die nach der unter 3. beschriebenen Methode isolierten Chloroplasten-Lamellarsysteme werden mit 10 mM NaCl auf 2 mg Chl/ml eingestellt. Diese Suspension wird mit 0,75 mM EDTA auf 0,1 mg Chl/ml verdünnt und 10 min bei RT gerührt. Durch Zugabe von 0,01 n NaOH wird der pH der Lösung auf pH 7,2 konstant gehalten. Sollen Thylakoide mit größerem Restgehalt an CF_1 isoliert werden, so wird dem Ablöseansatz 1 - 10 mM NaCl zugesetzt. Nach der EDTA-Behandlung wird 10 min bei 27000 xg zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgehoben oder abgegossen und kann als Ausgangsmaterial für CF_1 -Isolierung dienen. Das Sediment wird - wenn nicht anders angegeben - in 10 mM NaCl resuspendiert.

6. Isolierung und Reinigung von CF_1

Die Präparation von CF_1 erfolgt im wesentlichen nach der von LIEN & RACKER (64) veröffentlichten Methode. Ausgangsmaterial ist der unter 5. beschriebene EDTA-Überstand, der durch Zugabe konzentrierter Stammlösungen auf 20 mM Tris- SO_4 pH 8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - NaOH pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM ATP (20-20-1-1) gebracht und auf eine DEAE-Sepharose Cl-6B-Säule (2,5 cm $\varnothing$ x 12 cm) aufgetragen wird, die mit 20-20-1-1 äquilibriert worden war. Die Elution erfolgt nach Waschen mit 200 ml 20-40-1-1 mit einem linearen Gradienten von 20-40-1-1 bis 20-320-1-1 (je 300 ml). CF_1 wird unter diesen Bedingungen bei etwa 180 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluiert. Die CF_1 -haltigen Fraktionen werden mit gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung bis 60 % Sättigung gefällt und können bei 4° C mehrere Monate ohne größere Aktivitätsverluste gelagert werden. Zur weiteren Reinigung wird die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Suspension abzen-

trifugiert (17000 xg, 5 min) und in wenig 40-2-Puffer (40 mM Tricin-NaOH pH 7,8, 2 mM EDTA) gelöst. 1 ml der konzentrierten Protein-Lösung wird dann auf eine mit 40-2 äquilibrierte Sephacryl S-300 Säule (1,6 cm Ø x 75 cm) aufgetragen und mit etwa 10 ml/h eluiert. CF_1 -haltige Fraktionen werden wie oben mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällt.

7. Entsalzen eines Ammoniumsulfat-gefällten CF_1 -Präparats

Das benötigte Aliquot des als Ammoniumsulfat-Suspension gelagerten CF_1 wird in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und in möglichst wenig (ca. 0,3 ml) 40 mM Tricin-NaOH pH 7,8 2 mM EDTA gelöst. Durch Gelfiltration über Sephadex G 50 (1 cm Ø x 15 cm) in 40-2 wird das Ammoniumsulfat vom Protein abgetrennt. Die $(NH_4)_2SO_4$ -haltigen Fraktionen werden durch Zugabe von Neßler's Reagenz ermittelt und verworfen, die proteinhaltigen Fraktionen (Blasentest, Schaumbildung durch vorsichtiges Einblasen von Luft) werden vereinigt und die Proteinkonzentration nach LOWRY et al. (65) bestimmt.

8. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach LOWRY et al. (65) mit Rinderserumalbumin als Standard. Zu Triton X-100-haltigen Proben wird SDS, entsprechend 2 mM Endkonzentration, zugesetzt. Fraktionen, die Chlorophyll enthalten, werden mit 80 % Aceton extrahiert.

9. Zyklische Photophosphorylierung mit PMS nach AVRON (14)

1 ml Reaktionsansatz enthält folgende Substanzen:
50 mM Tricin-NaOH pH 8,5, 50 mM NaCl, 3 mM ADP-NaOH pH 7,2, 5 mM $MgCl_2$, 0,1 % RSA, 2 mM Na-ascorbat, 2 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8 mit ca. 1-2 μCi ^{32}P , 10 μg Chl und 0,1 mM PMS. Nach Pipettieren des Elektronentransportmediators PMS werden die Ansätze 1 min bei 20° C im Wasserbad vorinkubiert und exakt 1 min mit sättigendem Rotlicht ($12 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$) bestrahlt. Hierzu wird ein Rotfilter RG 610 der Fa. SCHOTT verwendet. Die Reaktion wird möglichst schnell mit 1 ml der

im folgenden Abschnitt beschriebenen Lösung abgestoppt.

Ansätze mit AS-Zugabe werden 20 min im Eisbad im kompletten Ansatz ohne PMS vorinkubiert.

10. Bestimmung des organisch gebundenen Phosphats nach SUGINO & MIYOSHI (109)

Der belichtete Phosphorylierungsansatz wird mit 1 ml der folgenden Lösung versetzt: 3 % (w/v) Ammoniumheptamolybdat; 5,5 % (v/v) konzentrierte HCl; 1 % (v/v) Triäthylamin und 1 % (v/v) gesättigtes Bromwasser. Die einzelnen Komponenten werden in der angegebenen Reihenfolge unter ständigem Rühren vermischt.

Das ausgefallene Protein und der schwerlösliche Triäthylamin-Phosphomolybdat-Komplex werden abzentrifugiert (20 min HETTICH, 3600 rpm). Vom klaren Überstand werden dann 0,5 ml zu 10 ml H₂O in Szintillationsgefäße pipettiert und im Szintillationszähler (PACKARD Tri-Carb, Diskriminatoren 30 bis ∞, Zählzeit 1-5 min) gezählt.

Standard: 20 µl aus der ³²P-Stammlösung werden 1:100 verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 0,1 ml zu 2 Proben in Szintillationsgefäße pipettiert.

Berechnung der Spezifischen Aktivität:

$$\mu\text{Mol ATP/mg Chl} \cdot \text{h} = \text{Faktor} \times \frac{\text{cpm}_{\text{Probe}}}{\text{cpm}_{\text{Probe+Stand.}} - \text{cpm}_{\text{Probe}}}$$

$$\text{Faktor} = \frac{4 \cdot 100 \cdot 60 \cdot 2}{100} = 480$$

4 : Verdünnungsfaktor der Probe

100 : Umrechnung auf 1 mg Chlorophyll

60 : Umrechnung von min auf h

2 : 2 µMol Phosphat im Ansatz

100 : Verdünnungsfaktor des Standards

11. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach LUGTEN- BERG et al. (66) modifiziert

Die PAGE wurde in einer Slabgel-Apparatur durchgeführt. Die

Abmessungen der verwendeten Trenngele betragen: Länge 85 mm, Breite 130 mm, Dicke 1,5 mm. Nach Polymerisation wird das Trenngel mit 3 cm Sammelgel überschichtet, das 20 Proben-taschen von 20 mm Länge enthält. Bei Breitbandgelen für Elektroblothing wird nur 1 cm Sammelgel ohne Taschen aufgegeben.

Folgende Lösungen werden benötigt:

- Lsg. 1: 44 % Acrylamid, 0,8 % Methylenbisacrylamid in H_2O
(Trenngel)
2: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (Trenngel)
3: 30 % Acrylamid, 0,8 % Methylenbisacrylamid in H_2O
(Sammelgel)
4: 0,25 M Tris-HCl pH 6,8 (Sammelgel)
5: 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat
6: 1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
7: N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

Für 13-18 % Acrylamid-Gradientengele mit 2,5 M Harnstoff werden zwei Trenngellösungen angesetzt, die für 2 Gele ausreichen. Sie enthalten 5,65 ml Lsg. 1 (13 % Acrylamid) bzw. 7,82 ml Lsg. 1 (18 % Acrylamid) sowie je 4,69 ml Lsg. 2, 0,375 ml Lsg. 5, 2,82 g Harnstoff und H_2O ad 18,3 ml. Nach Entgasen bei $4^{\circ}C$ werden 8,55 ml der 18 %igen Trenngel-Lsg. in die vordere und 8,55 ml der 13 %igen Trenngel-Lsg. in die hintere Kammer eines Gradientenmischers pipettiert und pro Mischkammer 105 μl Lsg. 6 und 8,5 μl Lsg. 7 unter Rühren zugegeben. Nach dem Öffnen der Verbindung zwischen den beiden Kammern wird das Gel mit Hilfe einer Schlauchpumpe nun langsam (2-3 ml/min) in die Gel-Apparatur eingepumpt und mit wenig Isopropanol überschichtet. Ist das Trenngel polymerisiert, wird das Isopropanol entfernt und das Gel mit Sammelgel überschichtet, das man aus 1,25 ml Lsg. 3, 6,25 ml Lsg. 4, 0,13 ml Lsg. 5, 1,94 g Harnstoff, 0,3 ml Lsg. 6, 25 μl Lsg. 7 und H_2O ad 12,55 ml mischt und kurz entgast. Nach 18 h Lagerung bei $4^{\circ}C$ ist das Gel gebrauchsfertig.

Gelegentlich wurden auch 12,5 % Acrylamid-Gele ohne Harnstoff eingesetzt, deren Zusammensetzung bis auf die Acrylamidkonzen-

tration mit den beschriebenen Gradientengelen Übereinstimmte.

Der Elektrodenpuffer enthält 3,025 g Tris, 14,45 g Glycin und 1 g SDS pro 1 l H₂O. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 27 mA bei RT durchgeführt (~ 4 h).

40 µl der zu analysierenden Proben (50-100 µg Protein) werden mit 60 µl Proteinlösungsgemisch (10 µl 0,63 M Tris-HCl pH 6,8, 5 µl 0,05 % Bromphenolblau in 50 % Glycerin, 20 µl 50 % Glycerin, 20 µl Lsg. 5 und 5 µl Mercaptoäthanol) vermischt und gewöhnlich 1 h bei RT oder bei 4° C ü.N. inkubiert.

Die Färbelösung besteht aus 0,87 g SERVA Blau G 250 in 450 ml 50 % Methanol + 50 ml Eisessig. Die Färbedauer beträgt 2 h, entfärbt wird in 7,5 % Eisessig, 5 % Methanol.

12. Immunisierung von Kaninchen nach BERZBORN (21)

Die Immunisierung von Kaninchen wird exakt nach der von BERZBORN (21) beschriebenen Methode durchgeführt.

13. Qualitative und quantitative immunologische Analysen

13.1. Zweidimensionale Immunodiffusion nach OUCHTERLONY (85)

Drei hintereinanderliegende Objektträger (76x26 mm) werden auf einem Rahmen der Fa. CAMAG zunächst mit 1 ml 0,8 % Agarose am Rand abgedichtet und dann mit 10 ml 0,8 % Agarose überschichtet. Die Agarose wird in Barbitalpuffer, pH 8,6, $\mu=0,02$, durch Kochen gelöst. Nach Erhärten werden zur Aufnahme der Antigene und Antiseren Löcher in bestimmter Anordnung in das Gel gestanzt (z.B. Abb. 10). In der Regel werden 6 µl Antigen bzw. Antiserum in die Löcher pipettiert. Die Diffusion erfolgt für ca. 24 h bei RT in einer feuchten Kammer. Danach werden die Gele samt Halterung je 2 x für 12 h in 2 % NaCl gewaschen; bei Anwesenheit chlorophyllhaltiger Antigene wird der Waschlösung ca. 0,1 % Triton X-100 zugesetzt. Anschließend wird noch einmal 12 h in Wasser gewaschen, danach die Gelschicht auf den Objektträgern getrocknet und die Proteinpräzipitate in 0,1 % Amidoschwarz, 45 % Methanol, 10 % Eisessig für 10 min gefärbt. Entfärbt wird 3 x 10 min in 45 % Methanol, 10 % Eisessig.

13.2. Einfache, eindimensionale Elektroimmunodiffusion (EID) nach LAURELL (62)

10 ml durch Erhitzen verflüssigtes, 0,8 %iges Agarose-Gel (Puffer wie in 13.1.) läßt man auf 58° C abkühlen, mischt dann schnell mit Antiserum und beschichtet wie unter 13.1 beschrieben 3 Objektträger. Nach Abkühlen und Erhärten des Gels werden in der Regel pro Objektträger 4 Löcher in die Agarose gestanzt, die zur Aufnahme von je 6 µl Antigen dienen. Die Elektrophorese erfolgt für 18 h bei 5,3 V/cm und 15° C. Der Elektrophoresepuffer besitzt die gleiche Zusammensetzung wie der Gelpuffer (siehe 13.1.). Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Objektträger wie unter 13.1. weiterbehandelt und danach die Rocketlängen ausgemessen. Eine vorläufige Bestimmung kann auch schon direkt nach der Elektrophorese bei Betrachtung im Dunkelfeld vorgenommen werden.

13.3. Kreuz-Immunelektrophorese nach CHUA & BLOMBERG (30)

Die Kreuz-Immunelektrophorese wird nach der Methode von CHUA & BLOMBERG (30) auf 10x10 cm Glasplatten durchgeführt.

Folgende Lösungen werden benötigt:

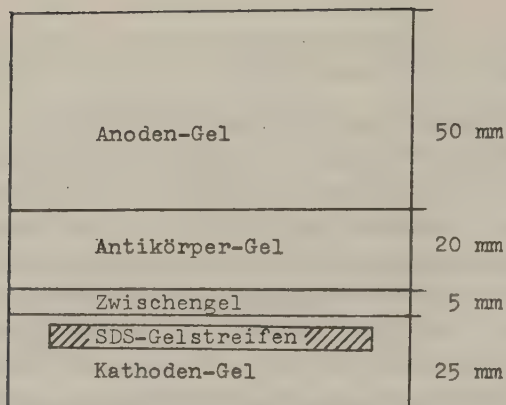
Lsg. 1: 1,2 % (w/v) Agarose in Puffer A (80 mM Tris, 40 mM Na-acetat, 1 mM EDTA - HCl pH 8,6)

2: 20 % (w/v) Lubrol PX

3: 10 % (w/v) Natriumdesoxycholat

4: 50 % (w/v) Polyäthylenglykol 4000 in Puffer A

15,7 ml Lsg. 1 (70° C) werden im Wasserbad mit 1,3 ml Lsg. 2 vermischt und auf die Glasplatte gegossen, deren Ränder vorher mit Agarose-Gel abgedichtet wurden. Nach Erkalten des Agarose-Gels werden für das Antikörper-Gel und das Kathoden-Gel mit einer Rasierklinge gemäß nachstehender Skizze Gelstreifen ausgeschnitten und entfernt. Für das Antikörper-Gel werden 3,2 ml Lsg. 1 mit 0,2 ml Lsg. 4 bei 70° C vermischt. Nach Abkühlen auf 58° C wird das AS zugegeben, gemischt und das Gel in den vorgesehenen Bereich für das Antikörper-Gel ausgegossen.



Der vorbereitete SDS-Gelstreifen wird kurz mit H_2O gewaschen, in 3 mm Abstand vom Zwischengelstreifen auf die Glasplatte ausgelegt und mit Kathoden-Gel (3,6 ml Lsg. + 0,4 ml Lsg. 3) um- und übergossen. Nach Erhärten wird die Elektrophorese bei $4^{\circ}C$ über Nacht durchgeführt (60 V).

Als Elektrophoresepuffer wird Puffer A verwendet. Zum Färben werden die Platten weiterbehandelt wie unter 13.1. beschrieben.

13.4. Immunoblotting nach TOWBIN et al. (114)

Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf Nitrocellulose-Filter wird das Trans-Blot-System der Fa. BIO-RAD verwendet. Eine Glasplatte des SDS-Gels wird entfernt und der zu transferierende Gelstreifen sowie ein Referenzgelstreifen ausgeschnitten. Der Gelstreifen wird auf mit Elektrophorese-Puffer getränktes Filterpapier gelegt und auf einen 6 mm dicken Schwamm placiert. Das Gel wird nun mit vorher zugeschnittener und in Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) angefeuchteter Nitrocellulose luftblasenfrei abgedeckt. Auf die Nitrocellulose wird wieder eine Lage Filterpapier und ein Schwamm gelegt. Das gesamte Sandwich wird durch Zusammendrücken fixiert und in die Halterung der mit 2,5 l Elektrophoresepuffer gefüllten Trans-Blot-Zelle eingebracht. Die Nitrocellulose befindet sich auf der Anoden-Seite der Elektrophorese-Kammer. Die Elektrophorese wird bei 200 V (ca. 50 mA) im Eisbad durchgeführt. Nach 4 h wird das Sandwich der Kammer entnommen und auf der Kathoden-Seite Schwamm und Filterpapier entfernt. Zur Kennzeichnung der Lage des SDS-Gels auf der Nitrocellulose wird das Gel mit wenig SERVA Blau W

in H_2O (1 %) umrandet. Danach wird das Gel entfernt und der Nitrocellulosefilter in 100 ml 2 % RSA, 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl 30 min inkubiert. Er kann dann luftgetrocknet und gelagert werden.

Für die Immunreaktion werden Nitrocellulose-Streifen von 5 mm Breite beschriftet und 10 min in 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl gewaschen. Die Streifen werden dann in Reagenzgläser überführt und in 7,5 ml 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 % RSA + 0,5-5 μ l Antiserum inkubiert. Die mit mehreren Lagen Parafilm abgedichteten Reagenzgläser werden in horizontaler Lage über Nacht bei 4° C inkubiert (Schüttler). Es muß darauf geachtet werden, daß die Nitrocellulose-Streifen vollständig benetzt werden. Danach werden die Streifen 4 x mit je 200 ml (für 20 Streifen) 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100 und 1 x mit 200 ml 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl gewaschen.

Die Nitrocellulose-Streifen werden dann in ca. 70 ml 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 % RSA überführt, 5-10 μ l ^{125}J -Protein A-Lsg. pro Gelstreifen zugegeben und 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Streifen werden dann 5 x mit je 200 ml 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100 gewaschen, luftgetrocknet und mit Klebeband auf Karton befestigt. Die Nitrocellulosestreifen werden mit Klarsichtfolie abgedeckt, ein KODAK X-Omat ART-Film aufgelegt und unter Verwendung eines Intensifying Screens (DUPONT Cronex Quanta III) bei -70° C 1-3 Tage lang exponiert.

14. Rekonstitution von CF_1 - CF_0 in Liposomen und Messung der ^{32}P -ATP-Austauschaktivität nach OKAMOTO et al. (83)

Zur Herstellung des "Lipidpuffers" werden 250 mg L- α -Phosphatidylcholin (L- α -Lecithin aus Soja-Bohne, SIGMA, Typ II-S), 100 mg Na-Cholat und 50 mg Na-DOC in 5 ml 20 mM Tricin-NaOH pH 8, 10 mM DTT, 0,4 mM EDTA unter N_2 -Begasung 10 min lang in Intervallen im Eisbad beschallt (BRANSON SONIFIER B-12, Microtip, Stufe 5). Zu je 0,8 ml des gelblich klaren Lipidpuffers (40 mg Lipid) werden je 0,2 ml der Proteinfractionen gegeben, in Dialyse-Schläuche eingefüllt und gegen 2,5 l

10 mM Tricin-NaOH pH 8, 2,5 mM MgSO_4 , 0,25 mM DTT, 0,2 mM EDTA 20 h bei 30° C dialysiert, wobei nach 4 h frisches Dialyse-Medium eingesetzt wird.

Zu je 0,2 ml der Rekonstitutionsansätze werden nun 20 μl 0,25 M DTT gegeben und 10 min bei 4° C inkubiert. Durch Zugabe von 0,78 ml Reaktionsmix wird die Reaktion gestartet. Die Konzentrationen im Reaktionsansatz betragen dann: 80 mM Tricin-NaOH pH 8, 5 mM ^{32}P -Phosphat-Puffer pH 8 (2×10^6 cpm), 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP. Nach 20 min Inkubation bei 37° C werden die Ansätze durch Zugabe von 0,1 ml 40 %iger TCA abgestoppt und in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Zu je 0,8 ml der abzentrifugierten Reaktionsansätze werden 1,5 ml 10 % Ammoniumheptamolybdat und 6 ml 1 N HClO_4 gegeben und vermischt. Nach 30 min Inkubation bei RT wird je 2 x mit 5 ml Isobutanol/Benzol 1:1, Isobutanol (H_2O gesättigt) und Äther extrahiert. Je 4 ml der wässrigen Phase werden im Szintillationszähler (siehe 10.) 5 min lang ausgezählt.

15. Messung lichtinduzierter pH-Änderungen im Suspensionsmedium isolierter Thylakoidsysteme

Die Messung der lichtinduzierten, reversiblen pH-Änderungen im Suspensionsmedium isolierter Thylakoidsysteme wurde mittels einer SCHOTT-pH-Einstabmeßkette N53 mit angeschlossenem pH-Meter 51 von RADIOMETER durchgeführt und mit einem SERVOGOR S Kompensationsschreiber RE 541 bei 100 - 500 mV Empfindlichkeit aufgezeichnet. Vor Versuchsbeginn wird das pH-Meter auf pH 6,5 geeicht (Radiometer Pufferlösung S 1001; 1:25 verdünnt: pH 6,5 $\pm$ 0,02).

Mit Hilfe eines Magnetrührers wird der Reaktionsansatz ständig gerührt und durch ein thermostatisiertes Wasserbad bei 15° C gehalten. Die Ansätze (3 ml Volumen) enthalten folgende Substanzen: 50 mM NaCl, 40 μg Chl/ml, 0,01 mM PMS und 0,2 bis 0,5 mM Tricin-NaOH pH 7,2.

Belichtet wird mit Rotlicht (Rotfilter RG 610 nm, SCHOTT). Vor der Belichtung wird der gewünschte Anfangs-pH (6,5) mit 0,1 n bzw. 0,01 n HCl oder NaOH eingestellt. Zur Bestimmung der Pufferkapazität (b) des Reaktionsansatzes werden nach jedem Ver-

sich 5 bis 10 µl 0,01 n HCl zum Ansatz zugegeben und die daraus resultierende pH-Änderung ($pH_{\text{Titration}}$) protokolliert. Die Berechnung der aus dem Medium aufgenommenen nÄquivalente H^+ erfolgt dann nach folgenden Gleichungen:

$$\frac{n\text{Äquiv. } H^+}{\text{mg Chl}} = b \times \frac{pH_{\text{Belichtung}}}{\text{mg Chl}}$$

$$b \text{ (Pufferkapazität)} = \frac{n \text{ Äquiv. } H^+ \text{ zugegeben}}{pH_{\text{Titration}}}$$

16. Konzentrierung von Proteinfraktionen

Proteinlösungen werden durch Druckfiltration (ca. 3 kp/cm²) je nach Molekulargewicht der betreffenden Proteine über AMICON YM 5 - Filter (Abscheidegrad: 5 kd) oder AMICON XM 100-Filter (Abscheidegrad 100 kd) bei 4° C konzentriert.

17. Cholat/Octylglucosid-Extraktion von CF₁-CF₀ modifiziert nach PICK & RACKER (86)

Isolierte Lamellarsysteme (3. Methode) werden 3 mal mit 30 mM Tris-SO₄, 10 mM Tricin-NaOH, 150 mM NaCl (pH 8,2) gewaschen und in 250 mM Saccharose, 10 mM Tricin-NaOH pH 8 aufgenommen und auf 2 mg Chl/ml eingestellt. Durch Zugabe einer konzentrierten Stammlösung wird die Suspension auf 5 mM DTT gebracht und 20 min bei 4° C gerührt. Zu 20 ml dieser Chloroplasten-Suspension werden dann 20 ml der folgenden, vorgekühlten Lsg. zugegeben: 10 mM Tricin-NaOH pH 8, 250 mM Saccharose, 0,8 M (NH₄)₂SO₄, 2 % (w/v) Octylglucosid, 1 % (w/v) Na-Cholat. Nach 20 min Inkubation auf Eis wird die Suspension in der Ultrazentrifuge 1 h bei 300000 xg zentrifugiert. Der grüne Überstand (Extrakt) wird durch Zugabe von 157 mg (NH₄)₂SO₄/ml Extrakt bis 37 % Sättigung gefällt und 20 min bei 4° C gerührt. Nach Abzentrifugation (10 min, 17000 xg) wird der Überstand durch Zugabe von 160 mg (NH₄)₂SO₄/ml Überstand bis 55 % Sättigung gefällt und wieder 20 min bei 4° C gerührt. Das präzipitierte Protein (37 % - 55 % Sättigung) wird abzentrifugiert und in möglichst wenig 30 mM Tris-Succinat pH 6,5, 0,2 % Triton X-100, 0,5 mM EDTA, 0,1 % Lipide gelöst. Je 0,5 ml der grünen Proteinfraktion werden nun auf Sucrose-

Dichte-Gradienten aufgetragen, die aus einem 12-40 %igen linearen Sucrosegradienten (7ml) und je 1,4 ml 12 %, 9,5 % und 7 % Saccharose-Lsg. bestehen. Die Saccharose-Lsg. enthalten 0,2 % Triton X-100, 30 mM Tris-Succinat pH 6,5, 0,1 % Lipide. Die Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation wird über Nacht (ca. 18 h) im SW 41-Rotor bei 35000 rpm (4° C) durchgeführt. Die Fraktionierung der Sucrose-Gradienten erfolgt durch Absaugen mittels Schlauchpumpe von oben, gewöhnlich werden etwa 15 Fraktionen à 0,7 ml gesammelt.

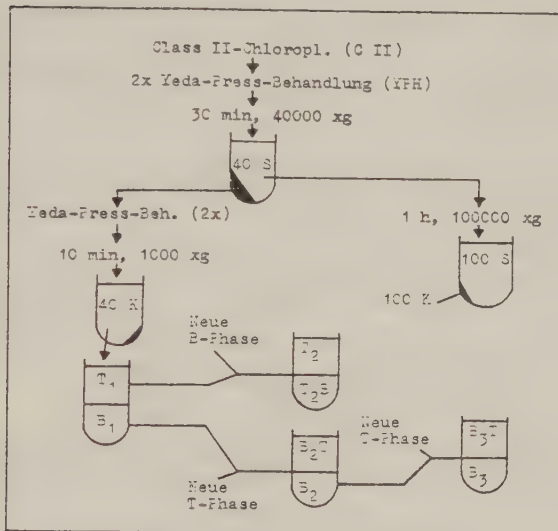
18. Präparation von inside-out- und right-side-out-Vesikeln nach ANDERSSON et al. (5, 6, 11)

Für die Präparation von i.o.- und r.s.o.-Vesikeln werden Chloroplasten (Class II) nach der von ANDERSSON et al. (6) beschriebenen Methode isoliert und in 50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,4, 150 mM NaCl resuspendiert. Nach zweimaliger Passage durch die Yeda-Presse bei einem N₂-Druck von 10 MPa wird das Homogenat (YPH) 30 min bei 40000 xg zentrifugiert. Der Überstand der 40 K-Zentrifugation wird 1 h bei 100000 xg zentrifugiert. Pellet (100 K, Stromalamellen) und Überstand (100 S) werden aufgehoben. Das Pellet (40 K), das die gebildeten i.o.- und r.s.o.-Vesikel enthält, wird in 100 mM Saccharose, 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,4, 5 mM NaCl resuspendiert (ca. 1,5 mg Chl/ml) und einer zweiten Yeda-Press-Behandlung unterzogen. Stärkekörner und ungebrochene Lamellen werden durch Zentrifugation (10 min, 1000 xg) entfernt. Der Überstand (40 K) wird zur Fraktionierung durch Phasen-Verteilung auf einem Polyäthylenglykol/Dextran-Polymerengemisch verwendet.

5 ml dieser Suspension werden zu einem 20 g-Phasensystem gegeben, das folgende Substanzen enthält: 7,125 % (w/v) Dextran T 500, 7,125 % (w/w) Polyäthylenglykol 4000, 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,4, 5 mM NaCl. Nach sorgfältigem Mischen des 2-Phasensystems (60 x kippen) wird es 3 min in einer HETTICH-Zentrifuge (Aus-schwingrotor) zentrifugiert, um die Phasentrennung zu beschleunigen.

Die obere, Polyäthylenglykol-reiche Phase (T₁) ist angereichert an r.s.o.-Vesikel, die untere, Dextran-reiche Phase (B₁) an i.o.-Vesikeln. Zur weiteren Reinigung der Vesikel werden T₁ bzw. B₃ gem.

dem in Abb.48 gezeigten Schema weiterbehandelt. Zur Entfernung der Polymere werden die Fraktionen des Phasensystems in 100 mM



IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. AKERLUND, H.-E., ANDERSSON, B., PERSSON, A. & ALBERTSSON, P.-A.: Isoelectric points of spinach thylakoid membrane surfaces as determined by cross partition. *Biochim. Biophys. Acta* 552, 238-246 (1979)
2. AKERLUND, H.-E. & JANSSON, C.: Localization of a 34000 and a 23000 M_r polypeptide to the lumenal side of the thylakoid membrane. *FEBS Letters* 124, 229-232 (1981)
3. ALTENDORF, K.: Purification of the DCCD-reactive protein of the energy-transducing adenosine triphosphatase complex from *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 73, 271-275 (1977)
4. ANDERSON, J.M.: Consequences of spatial separation of photosystem 1 and 2 in thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Letters* 124, 1-10 (1981)
5. ANDERSSON, B. & AKERLUND, H.-E.: Inside-out membrane vesicles isolated from spinach thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta* 503, 462-472 (1978)
6. ANDERSSON, B., AKERLUND, H.-E. & ALBERTSSON, P.-A.: Separation of subchloroplast membrane particles by counter-current distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 423, 122-132 (1976)
7. ANDERSSON, B. & ANDERSON, J.M.: Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 593, 427-440 (1980)
8. ANDERSSON, B., ANDERSON, J.M. & RYRIE, I.J.: Transbilayer organization of the chlorophyll-proteins of spinach thylakoids. *Eur. J. Biochem.* 123, 465-472 (1982)
9. ANDERSSON, B. & HAEHNEL, W.: Location of photosystem I and photosystem II reaction centers in different thylakoid regions of stacked chloroplasts. *FEBS Letters* 146, 13-17 (1982)
10. ANDERSSON, B., KLEIN-HITPASS, L., JANSSON, C. & BERZBORN, R.J.: Immunological characterization of a 34 kDa polypeptide from spinach thylakoids. *Manuskript in Vorbereitung*
11. ANDERSSON, B., SUNDBY, C. & ALBERTSSON, P.-A.: A mechanism for the formation of inside-out membrane vesicles. Preparation of inside-out vesicles from membrane-paired randomized chloroplast lamellae. *Biochim. Biophys. Acta* 599, 391-402 (1980)
12. ANDREO, C.S., PATRIE, W.J. & MCCARTY, R.E.: Effect of ATPase activation and the δ subunit of coupling factor 1 on reconstitution of photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 257, 9968-9975 (1982)

13. ARNON, D. I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*.
Plant Physiol. 24, 1-5 (1949)
14. AVRON, M.: Photophosphorylation by swiss-chard chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 40, 257-272 (1960)
15. AVRON, M.: A coupling factor in photophosphorylation.
Biochim. Biophys. Acta 77, 699-702 (1963)
16. BAIRD, B.B. & HAMMES, G.G.: Chemical cross-linking studies of chloroplast coupling factor 1.
J. Biol. Chem. 251, 6953-6962 (1976)
17. BARBER, J. & CHOW, W.S.: A mechanism for controlling the stacking and unstacking of chloroplast thylakoid membranes.
FEBS Letters 105, 5-10 (1979)
18. BENNUN, A., & RACKER, E.: Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. IV. Interaction of coupling factor 1 from chloroplasts with components of the chloroplast membrane.
J. Biol. Chem. 244, 1325-1331 (1969)
19. BERZBORN, R.J.: Untersuchungen über die Oberflächenstruktur des Thylakoidsystems der Chloroplasten mit Hilfe von Antikörpern gegen die Ferredoxin-NADP-Reduktase.
Z. f. Naturf. 24b, 436-446 (1969)
20. BERZBORN, R.J.: Trennung von Untereinheiten des Kopplungsfaktor 1 der Chloroplasten (CF_1) und deren immunologische Charakterisierung.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 693 (1972)
21. BERZBORN, R.J.: Antibody approach to membrane architecture
In: Methods in Enzymology (SAN PIETRO, A. ed.)
Vol. 69, 492-502, Academic Press, New York (1980)
22. BERZBORN, R.J. & LOCKAU, W.: Antibodies
In: Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Vol. 5, 282-296 (TREBST, A. & AVRON, M. eds.). Berlin, Heidelberg (1977)
23. BERZBORN, R.J. MENKE, W., TREBST, A. & PISTORIUS, E.: Über die Hemmung photosynthetischer Reaktionen isolierter Chloroplasten durch Chloroplasten-Antikörper.
Z. f. Naturf. 21b, 1057-1059 (1966)
24. BERZBORN, R.J., MÜLLER, D., ROOS, P. & ANDERSSON, B.: Significance of different quantitative determinations of photosynthetic ATP-synthase CF_1 for hebergeous CF_1 -distribution and grana formation.
In: Proc. 5th int. Congr. Photosynthesis, Vol. III: Structure and molecular organization of the photosynthetic membrane. pp. 107-120 (AKOYUNOGLU, G. ed.). Philadelphia. (1981)
25. BERZBORN, R.J. & ROOS, P.: Immunological determination of photosynthetic ATP-synthase CF_1 .
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 361, 1476-1477 (1980)

26. BERZBORN, R.J. & SCHRÖER, P.: Photophosphorylation: mechanism of reconstitution by coupling factor 1 (CF₁)
FEBS Letters 70, 271-275 (1976)
27. BINDER, A., JAGENDORF, A. & NGO, E.: Isolation and composition of the subunits of spinach chloroplast coupling factor protein.
J. Bio. Chem. 253, 3094-3100 (1978)
28. BOYER, P.D.: Coupling mechanisms in capture, transmission, and use of energy.
Ann. Rev. Biochem. 46, 957-966 (1977)
29. CARMELI, C. & RACKER, E.: Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XIV. Reconstitution of chlorophyll-deficient vesicles catalyzing phosphate-adenosine triphosphate exchange.
J. Biol. Chem. 248, 8281-8287 (1973)
30. CHUA, N.-H. & BLOMBERG, F.: Immunochemical studies of thylakoid membrane polypeptides from spinach and *Chlamydomonas reinhardtii*.
J. Biol. Chem. 254, 215-223 (1979)
31. CRIDDLE, R.S., JOHNSTON, R.F. & STACK, R.J.: Mitochondrial ATPases.
Current Topics in Bioenergetics 9, 89-145 (1979)
32. CZARNECKI, J.J., ABBOTT, M.S. & SELMAN, B.R.: Photoaffinity labeling with 2-azidoadenosine diphosphate of a tight nucleotide binding site on chloroplast coupling factor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7744-7748 (1982)
33. DECKER, K.P. BRUSILOV, W.S.A., GUNSALUS, R.P. & SIMONI, R.D.: In vitro membrane association of the F₀ polypeptides of the *Escherichia coli* proton translocating ATPase.
J. Bacteriol. 152, 815-821 (1982)
34. DIJKMANS, H. & DANIEL, A.-M.: Binding of the chloroplast coupling factor CF₁ to lipid vesicles.
Can. J. Biochem. 59, 16-21 (1981)
35. ENNS, R. & CRIDDLE, R.S.: Investigation of the structural arrangement of the protein subunits of mitochondrial ATPase.
Arch. Biochem. Biophys. 183, 742-752 (1977)
36. FARRON, F.: Isolation and properties of a chloroplast coupling factor and heat-activated adenosine triphosphatase
Biochemistry 9, 3823-3828 (1970)
37. FARRON, F. & RACKER, E.: Studies on the mechanism of the conversion of coupling factor 1 from chloroplasts to an active adenosine triphosphatase.
Biochemistry 9, 3829-3836 (1970)
38. FILLINGAME, R.H.: Purification of the carbodiimide-reactive protein component of the ATP energy-transducing system of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 251, 6630-6637 (1976)

39. FILLINGAME, R.H.: Biochemistry and genetics of bacterial H^+ -Translocating ATPase.
Current Topics in Bioenergetics 11, 35-106 (1981)
40. FILLINGAME, R.H., MOSHER, M.E., NEGRIN, R.S. & KAY PETERS, L.: H^+ -ATPase of *Escherichia coli*. unc B 402 mutation leads to loss of X subunit of F_0 sector.
J. Biol. Chem. 258, 604-609 (1983)
41. FRIEDL, P., BIENHAUS, G., HOPPE, J. & SCHAIRER, H.U.: The dicyclohexylcarbodiimide-binding protein of ATP synthase from *Escherichia coli* is not sufficient to express an efficient H^+ conduction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6643-6646 (1981)
42. GARBER, M.P. & STEPONKUS, P.L.: Identification of chloroplast coupling factor by freeze-etching and negative-staining techniques.
J. Cell Biol. 63, 24-38 (1974)
43. GEUSS, U.: Über unterschiedliche Formen und Mengen der photosynthetischen Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (E.C. 1.6.7.1.) in Chloroplasten.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1983)
44. GRAF, T. & SEBALD, W.: The dicyclohexylcarbodiimide-binding protein of the mitochondrial ATPase complex from beef heart.
FEBS Letters 94, 218-222 (1978)
45. HARMS, E., ROHDE, W., BOSCH, F. & SCHOLTISSEK, C.: Biochemical studies on influenza viruses.
Virology 86, 413-422 (1978)
46. HAUSKA, G., SAMORAY, D., ORLICH, G. & NELSON, N.: Reconstitution of photosynthetic energy conservation. II. Photophosphorylation in liposomes containing photosystem I reaction center and chloroplast coupling-factor complex.
Eur. J. Biochem. 111, 535-543 (1980)
47. HEIDELBERGER, M. zitiert nach CAMPBELL, D.H., GARVEY, J.S., CREMER, N.E. & SUSSDORF, D.H.:
In: Methods in immunology, Benjamin, New York (1963)
48. HELENIUS, A. & SIMONS, K.: Solubilization of membranes by detergents.
Biochem. Biophys. Acta 415, 29-79 (1975)
49. HERMANN, R.G., WESTHOFF, P., ALT, J., WINTER, P., TITTEGEN, J., BISANZ, C., SEARS, B.B., NELSON, N., HURT, E., HAUSKA, G., VIEBROCK, A. & SEBALD, W.: Identification and characterization of genes for polypeptides of the thylakoid membrane.
In: Structure and function of plant genomes (CIFFERI, O., ed.). Academic press, New York (1983)
50. HESSE, H., JANK-LADWIG, R. & STROTMANN, H.: On the reconstitution of photophosphorylation in CF_1 -extracted chloroplasts.
Z. f. Naturf. 31c, 445-451 (1976)

51. HITCHENS, G.D. & KELL, D.B.: On the extent of localization of the energized membrane state in chromatophores from *Rhodospseudomonas capsulata* N22. *Biochem. Journal* 206, 351-357 (1982)
52. HOWELL, S.H. & MOUDRIANAKIS, E.N.: Function of the quanta-some in photosynthesis: Structure and properties of membrane-bound particle active in the dark reactions of photophosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 1261-1268 (1967)
53. JAGENDORF, A.T. & HIND, G.: In: Photosynthetic mechanism in green plants. *Nat. Acad. Sci. Nat. Res. Council* 1145, 559-610 (1963)
54. JAGENDORF, A.T. & SMITH, M.: Uncoupling of phosphorylation in spinach chloroplasts by absence of cations. *Plant Physiol.* 37, 135-141 (1962)
55. JAGENDORF, A.T. & URIBE, E.: ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55, 170-177 (1966)
56. JENNINGS, R.C., GARLASCHI, F.M., GEROLA, P.D. & FORTI, G.: Partition zone penetration by chymotrypsin and the localization of the chloroplast flavoprotein and photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 546, 207-219 (1979)
57. KANNANGARA, C.G., VAN WYK, D. & MENKE, W.: Immunological evidence for the presence of latent Ca^{2+} dependent ATPase and carboxydismutase on the thylakoid surface. *Z. f. Naturf.* 25b, 613-618 (1970)
58. KLEIN-HITPASS, L.: Untersuchungen zum Mechanismus der Hemmung photosynthetischer Phosphorylierungsreaktionen durch Antikörper. *Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum* (1979)
59. KOENIG, F., RADUNZ, A., SCHMID, G.H. & MENKE, W.: Antisera to the coupling factor of photophosphorylation and its subunits. *Z. f. Naturf.* 33c, 529-536 (1978)
60. KRØLL, J.: Production of specific antisera by immunization with precipitin lines. In: *Methods in Enzymology* (LANGONE, J.J. & VAN VUNAKIS, H., eds.). Vol. 73, Part B, 52-57 (1981)
61. KUWABARA, T. & MURATA, N.: Purification and characterization of 33 kilodalton protein of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 581, 228-236 (1979)
62. LAURELL, C.-B.: Quantitative estimation of protein by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 15, 45-52 (1966)
63. LIEN, S., BERZBORN, R.J. & RACKER, E.: Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. IX. Studies on the subunit structure of coupling factor 1 from chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 247, 3520-3524 (1972)

64. LIEN, S. & RACKER, E.: Preparation and assay of chloroplast coupling factor CF₁.
In: Methods in enzymology, Vol. XXIII, pp 547-555
(SAN PIETRO, A., ed.). Academic Press, New York (1971)
65. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
66. LUGTENBERG, B., MEIJERS, J., PETERS, R., VAN DER HOEK, P. & VAN ALPHEN, L.: Electrophoretic resolution of the 'major outer membrane protein' of Escherichia coli K12 into four bands.
FEBS Letters 58, 254-258 (1975)
67. McCARTY, R.E. & RACKER, E.: Effect of a coupling factor and its antiserum on photophosphorylation and hydrogen ion transport.
Brookhaven Symp. Biol. 19, 202-214 (1966)
68. McCARTY, R.E. & RACKER, E.: Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. II. The inhibition and stimulation of photophosphorylation by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide.
J. Biol. Chem. 242, 3435-3439 (1967)
69. MILLER, K.R., MILLER, G.J. & McINTYRE, K.R.: Organization of the photosynthetic membrane in maize mesophyll and bundle sheath chloroplasts.
Biochem. Biophys. Acta 452, 145-156 (1977)
70. MILLER, K.R. & STAEHELIN, L.A.: Analysis of the thylakoid outer surface. Coupling factor is limited to unstacked membrane regions.
J. Cell Biol. 68, 30-47 (1976)
71. MITCHELL, P.: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.
Nature 191, 144-148 (1961)
72. MITCHELL, P.: A chemiosmotic molecular mechanism for proton-translocating adenosine triphosphatase.
FEBS Letters 43, 189-194 (1974)
73. MULLET, J.E., PICK, U. & ARNTZEN, C.J.: Structural analysis of the isolated chloroplast coupling factor and the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide binding proteolipid.
Biochim. Biophys. Acta 642, 149-157 (1981)
74. NECHUSHTAI, R., NELSON, N., MATTOO, A.K. & EDELMANN, M.: Site of synthesis of subunits to photosystem I reaction center and the proton-ATPase in Spirodela.
FEBS Letters 125, 115-119 (1981)
75. NELSON, N.: Structure and function of chloroplast ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 456, 314-338 (1976)
76. NELSON, N.: Chloroplast coupling factor.
In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 5, pp 393-404 (TREBST, A. & AVRON, M., eds.), Berlin, Heidelberg (1977)

77. NELSON, N.: Proton-ATPase of chloroplasts.
In: Current topics in bioenergetics, Vol. 11, pp 1-33
(SANADI, D.R. & VERNON, L.P. eds.). Academic Press,
New York (1981)
78. NELSON, N., DETERS, D.W., NELSON, H. & RACKER, E.: Partial
resolution of the enzymes catalyzing photophosphory-
lation. XIII. Properties of isolated subunits of
coupling factor 1 from spinach chloroplasts.
J. Biol. Chem. 248, 2049-2055 (1973)
79. NELSON, N., EYTAN, E., NOTSANI, B.-E., SIGRIST, H., SIGRIST-
Nelson, K. & GITLER, C.: Isolation of a chloroplast
N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid,
active in proton translocation.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 74, 2375-2378 (1977)
80. NELSON, N., NELSON, H. & RACKER, E.: Partial resolution of
the enzymes catalyzing photophosphorylation. XII.
Purification and properties of an inhibitor isolated
from chloroplast coupling factor 1.
J. Biol. Chem. 247, 7657-7662 (1972)
81. NELSON, N., NELSON, H. & SCHATZ, G.: Biosynthesis and assem-
bly of the proton-translocating adenosine triphospha-
tase complex from chloroplasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1361-1364 (1980)
82. NEUMANN, J. & JAGENDORF, A.T.: Light-induced pH changes
related to phosphorylation by chloroplasts.
Arch. Biochem. Biophys. 107, 109-119 (1964)
83. OKAMOTO, H., SONE, N., HIRATA, H. YOSHIDA, M. & KAGAWA, Y.:
Purified proton conductor in proton translocating ade-
nosine triphosphatase of a thermophilic bacterium.
J. Biol. Chem. 252, 6125-6131 (1977)
84. OLESZKO, S. & MOUDRIANAKIS, E.N.: The visualization of the
photosynthetic coupling factor in embedded spinach
chloroplasts.
J. Cell Biol. 63, 936-948 (1974)
85. OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological
analysis.
Progr. Allergy 6, 30-154 (1962)
86. PICK, U. & RACKER, E.: Purification and reconstitution of
the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase
complex from spinach chloroplasts.
J. Biol. Chem. 254, 2793-2799 (1979)
87. ROOS, P.: Untersuchungen zur Spezifität der Bindung der pe-
ripheren ATPase (CF₁) in der photosynthetischen ATP-
Synthase.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1978)
88. ROOS, P.: Untersuchungen zur Interaktion des Kopplungsfaktors
der photosynthetischen Phosphorylierung mit der Thyla-
koidmembran durch immunchemische Methoden.
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1982)

89. ROOS, P. & BERZBORN, R.J.: Immunchemische Bestimmung der photosynthetischen ATP-Synthase CF_1 . Botanikertagung in Bochum, Kurzfassung der Vorträge und Poster, p. 131. - Bochum (1980)
90. SCHNEIDER, E. & ALTENDORF, K.: Reconstitution of the purified proton conductor (F_0) of the adenosine triphosphatase complex from *Escherichia coli*. FEBS Letters 116, 173-176 (1980)
91. SCHNEIDER, E. & ALTENDORF, K.: ATP synthase (F_1F_0) of *Escherichia coli* K-12. High-yield preparation of functional F_0 by hydrophobic affinity chromatography. Eur. J. Biochem. 126, 149-153 (1982)
92. SCHNEIDER, E., FRIEDL, P., SCHWULERA, U. & DOSE, K.: Energy-linked reactions catalyzed by the purified ATPase complex (F_0F_1) from *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. Eur. J. Biochem. 108, 331-336 (1980)
93. SCHULZE-KELLING, R.: Über lichtabhängige H^+ -Translokationen isolierter Thylakoidsysteme aus Chloroplasten. Hausarbeit der Fachprüfung für das Lehramt an Gymnasien, Ruhr-Universität Bochum (1978)
94. SEBALD, W., GRAF, T. & LUKINS, H.B.: The dicyclohexylcarbodiimide-binding protein of the mitochondrial ATPase complex from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 93, 587-599 (1979)
95. SEBALD, W. & HOPPE, J.: On the structure and genetics of the proteolipid subunit of the ATP synthase complex. Current Topics in Bioenergetics 12, 1-64 (1982)
96. SEBALD, W., HOPPE, J. & WACHTER, E.: Amino acid sequence of the ATPase proteolipid from mitochondria, chloroplasts and bacteria (wild type and mutants). In: Function and molecular aspects of biomembrane Transport, pp. 63-74 (QUAGLIARIELLO, E. et al. eds.). - Elsevier, Amsterdam (1979)
97. SENIOR, A.E.: The structure of mitochondrial ATPase. Biochim. Biophys. Acta 301, 249-277 (1973)
98. SENIOR, A.E.: The mitochondrial ATPase. In: Membrane proteins in energy transduction. pp 233-278 (CAPALDI, R.A. ed.). New York, Basel. (1979)
99. SHOSHAN, V. & SHAVIT, N.: ATP synthesis and hydrolysis in chloroplast membranes. Differential inhibition by antibodies to chloroplast coupling factor 1. Eur. J. Biochem. 94, 87-92 (1979)
100. SIGRIST, H., SIGRIST-NELSON, K. & GITLER, C.: Single-phase butanol extraction: a new tool for proteolipid isolation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 178-184 (1977)

101. SIGRIST-NELSON, K. & AZZI, A.: Purification of the chloroplast-membrane dicyclohexylcarbodi-imide-binding proteolipid by ion-exchange chromatography. *Biochem. J.* 177, 687-692 (1979)
102. SIGRIST-NELSON, K. & AZZI, A.: The proteolipid subunit of the chloroplast adenosine triphosphatase complex. Reconstitution and demonstration of proton-conductivity properties. *J. Biol. Chem.* 255, 10638-10643 (1980)
103. SIGRIST-NELSON, K., SIGRIST, H. & AZZI, A.: Characterization of the dicyclohexylcarbodiimide-binding protein isolated from chloroplast membranes. *Eur. J. Biochem.* 92, 9-14 (1978)
104. SMITH, J.B. & STERNWEIS, P.C.: Purification of membrane attachment and inhibitory subunits of the proton translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 16, 306-311 (1977)
105. SONE, N., YOSHIDA, M., HIRATA, H. & KAGAWA, Y.: Purification and properties of a dicyclohexylcarbodiimide-sensitive adenosine triphosphatase from a thermophilic bacterium. *J. Bio. Chem.* 250, 7917-7923 (1975)
106. SONE, N., YOSHIDA, M., HIRATA, H. & KAGAWA, Y.: Resolution of the membrane moiety of the H^+ -ATPase complex into two kinds of subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4219-4223 (1978)
107. STEFFENS, K., KILTZ, H.H., SCHNEIDER, E., SCHMIDT, R. & ALTENDORF, K.: ATP-synthetase complex (F_1F_0) from *Escherichia coli*. Purification and characterization of subunits a and b of the F_0 part. *FEBS Letters* 142, 151-154 (1982)
108. STERNWEIS, P.C.: The ϵ subunit of *Escherichia coli* coupling factor 1 is required for its binding to the cytoplasmatic membrane. *J. Biol. Chem.* 253, 3123-3128 (1978)
109. SUGINO, Y. & MIYOSHI, Y.: The specific coprecipitation of orthophosphate and some biochemical application. *J. Biol. Chem.* 239, 2360-2364 (1964)
110. SÜSS, K.-H.: Identification of chloroplast thylakoid membrane polypeptides. *FEBS Letters* 112, 255-259 (1980)
111. SÜSS, K.-H. & MANTEUFFEL, R.: The chloroplast ATP synthetase consists of the subunits α , β , γ , δ , ϵ , and proteolipid only. Evidence that the components termed subunit I and II are proteolytically altered light-harvesting proteins. *FEBS Letters* 153, 134-140 (1983)

112. SÜSS, K.-H. & SCHMIDT, O.: Evidence for an $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon, \text{I}, \text{II}, \text{F}_1$ subunit stoichiometry of chloroplast ATP synthetase complex ($\text{CF}_1\text{-CF}_0$)
FEBS Letters 144, 213-218 (1982)
113. TANDY, N.E., DILLEY, R.A., HERMODSON, M.A. & BHATNAGAR, D.: Evidence for an interaction between protons released in chloroplast photosystem II water oxidation and the 8000 Mr hydrophobic subunit of the energy-coupling complex.
J. Biol. Chem. 257, 4301-4307 (1982)
114. TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4554 (1979)
115. VAMBUTAS, V.K. & RACKER, E.: Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. I. Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent Ca^{++} dependent adenosine triphosphatase from chloroplasts.
J. Biol. Chem. 240, 2660-2667 (1965)
116. WESTHOFF, P., NELSON, N., BÜNEMANN, H. & HERMANN, R.G.: Localization of genes for coupling factor subunits on the spinach plastid chromosome.
Current Genetics 4, 109-120 (1981)
117. WILLIAMS, R.J.P.: Proton-driven phosphorylation reactions in mitochondrial and chloroplast membranes.
FEBS Letters 53, 123-125 (1975)
118. WINGET, G.D., KANNER, N. & RACKER, E.: Formation of ATP by the adenosine triphosphatase complex from spinach chloroplasts reconstituted together with bacteriorhodopsin.
Biochim. Biophys. Acta 460, 490-499 (1977)
119. YOSHIDA, M., OKAMOTO, H., SONE, N., HIRATA, H. & KAGAWA, Y.: Reconstitution of thermostable ATPase capable of energy coupling from its purified subunits.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 936-940 (1977)
120. YOSHIDA, M., SONE, N., HIRATA, H. & KAGAWA, Y.: A highly stable adenosine triphosphatase from a thermophilic bacterium. Purification, properties and reconstitution.
J. Biol. Chem. 250, 7910-7916 (1975)
121. YOUNIS, H.M. & MORJANA, N.A.: Resolution of the chloroform-released CF_1 into ATPase complexes differing in their ATPase activity. Identification of a subunit as a putative natural inhibitor of the ATPase.
FEBS Letters 140, 317-319 (1982)
122. YOUNIS, H.M. & WINGET, G.D.: GF_1 -dependent restoration of energy-linked reactions reconstituted with a hydrophobic protein from spinach chloroplasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 168-174 (1977)

123. YOUNIS, H.M., WINGET, G.D. & RACKER, E.: Requirement of the δ subunit of chloroplast coupling factor 1 for photophosphorylation.
J. Biol. Chem. 252, 1814-1818 (1977)

Herrn Prof. Dr. R.J. Berzborn danke ich für die Arbeitsmöglichkeit und die stete Bereitschaft zu stimulierenden Diskussionen. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. P. Roos für wertvolle Tips und Anregungen.

Bei Frau R. Oworah-Nkruma, Frau C. Fischer und Herrn H. Winking bedanke ich mich für die Hilfe bei der Anfertigung zahlreicher Abbildungen und Fotos.

Herrn Prof. Dr. R.G. Hermann danke ich für die Möglichkeit, die Immunoblotting-Experimente in seinem Labor durchführen zu können, Herrn Dr. P. Westhoff schulde ich Dank für die sorgfältige Einarbeitung in diese Methode.

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 18.3.1954 in Ringenberg als Sohn der Eheleute Maria und Heinrich Klein-Hitpaß. Nach der fünften Volksschulklasse besuchte ich ab 1965 die Realschule Wesel. Nach der Mittleren Reife wechselte ich 1970 auf das Naturwissenschaftliche Gymnasium in Aufbauform in Wesel, an dem ich im Mai 1973 auch meine Reifeprüfung ablegte.

Nach dem Wehrdienst nahm ich zum Wintersemester 74/75 das Studium der Biologie an der Ruhr-Universität in Bochum auf. Die mündlichen Diplom-Hauptprüfungen wurden im Juni 1978 abgelegt. Nach Abschluß der experimentellen Diplomarbeit im Oktober 1979 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation.

